

**CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON**

Année 2023 - Thèse n° 037

**UTILISATION D'UN ANTICORPS ANTI-ERG DANS LE  
DIAGNOSTIC HISTOLOGIQUE DES TUMEURS  
VASCULAIRES SPLÉNIQUES CHEZ LE CHIEN :  
APPLICATION AUX TUMEURS À CELLULES  
FUSIFORMES**

**THESE**

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1  
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 15 septembre 2023  
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

KLEIN Césarine



**CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON**

Année 2023 - Thèse n° 037

**UTILISATION D'UN ANTICORPS ANTI-ERG DANS LE  
DIAGNOSTIC HISTOLOGIQUE DES TUMEURS  
VASCULAIRES SPLÉNIQUES CHEZ LE CHIEN :  
APPLICATION AUX TUMEURS À CELLULES  
FUSIFORMES**

**THESE**

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1  
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 15 septembre 2023  
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

KLEIN Césarine





## Liste des enseignants au 20/03/2023

Pr	ABITBOL	Marie	Professeur
Dr	ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences
Pr	ARCANGIOLI	Marie-Anne	Professeur
Dr	AYRAL	Florence	Maître de conférences
Pr	BECKER	Claire	Professeur
Dr	BELLUCO	Sara	Maître de conférences
Dr	BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences
Pr	BENOIT	Etienne	Professeur
Pr	BERNY	Philippe	Professeur
Pr	BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur
Dr	BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences
Dr	BRUTO	Maxime	Maître de conférences
Dr	BRUYERE	Pierre	Maître de conférences
Pr	BUFF	Samuel	Professeur
Pr	BURONFOSSE	Thierry	Professeur
Dr	CACHON	Thibaut	Maître de conférences
Pr	CADORÉ	Jean-Luc	Professeur
Pr	CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Professeur
Pr	CHABANNE	Luc	Professeur
Pr	CHALVET-MONFRAY	Karine	Professeur
Dr	CHANOIT	Gullaume	Professeur
Dr	CHETOT	Thomas	Maître de conférences
Pr	DE BOYER DES ROCHES	Alice	Professeur
Pr	DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur
Pr	DJELOUADJI	Zorée	Professeur
Dr	ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences
Dr	FRIKHA	Mohamed-Ridha	Maître de conférences
Dr	GALIA	Wessam	Maître de conférences
Pr	GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur
Dr	GONTHIER	Alain	Maître de conférences
Dr	GREZEL	Delphine	Maître de conférences
Dr	HUGONNARD	Marine	Maître de conférences
Dr	JOSSON-SCHRAMME	Anne	Chargé d'enseignement contractuel
Pr	JUNOT	Stéphane	Professeur
Pr	KODJO	Angeli	Professeur
Dr	KRAFFT	Emilie	Maître de conférences
Dr	LAABERKI	Maria-Halima	Maître de conférences
Dr	LAMBERT	Véronique	Maître de conférences
Pr	LE GRAND	Dominique	Professeur
Pr	LEBLOND	Agnès	Professeur
Dr	LEDOUX	Dorothée	Maître de conférences
Dr	LEFEBVRE	Sébastien	Maître de conférences
Dr	LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Maître de conférences
Dr	LEGROS	Vincent	Maître de conférences
Pr	LEPAGE	Olivier	Professeur
Pr	LOUZIER	Vanessa	Professeur
Dr	LURIER	Thibaut	Maître de conférences
Dr	MAGNIN	Mathieu	Maître de conférences
Pr	MARCHAL	Thierry	Professeur
Dr	MOSCA	Marion	Maître de conférences
Pr	MOUNIER	Luc	Professeur
Dr	PEROZ	Carole	Maître de conférences
Pr	PIN	Didier	Professeur
Pr	PONCE	Frédérique	Professeur
Pr	PORTIER	Karine	Professeur

Pr	POUZOT-NEVORET	Céline	Professeur
Pr	PROUILLAC	Caroline	Professeur
Pr	REMY	Denise	Professeur
Dr	RENE MARTELLET	Magalie	Maître de conférences
Pr	ROGER	Thierry	Professeur
Dr	SAWAYA	Serge	Maître de conférences
Pr	SCHRAMME	Michael	Professeur
Pr	SERGENTET	Delphine	Professeur
Dr	TORTEREAU	Antonin	Maître de conférences
Dr	VICTONI	Tatiana	Maître de conférences
Dr	VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	Chargé d'enseignement contractuel
Pr	ZENNER	Lionel	Professeur

## **Remerciements au jury**

**À Madame le Professeur Yesim Dargaud,**

Professeur d'Hématologie à l'Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de médecine de Lyon  
Pour nous faire l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,  
Hommages respectueux.

**À Monsieur le Professeur Thierry Marchal,**

Professeur d'Anatomie Pathologique à VetAgro Sup, campus vétérinaire de Lyon,  
Pour avoir accepté d'encadrer ce travail et de me partager ses connaissances,  
Sincères remerciements.

**À Madame le Professeur Frédérique Ponce,**

Professeur de Cancérologie à VetAgro Sup, campus vétérinaire de Lyon,  
Pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour l'intérêt porté à ce travail,  
Sincères remerciements.

**À Madame Nadège Milhau,**

Ingénieure de recherche au laboratoire d'histopathologie de VetAgro Sup, campus vétérinaire de Lyon,  
Qui nous a fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.  
Pour sa participation à ce travail et ses conseils,  
Sincères remerciements.



## Table des matières

Liste des annexes.....	13
Liste des figures.....	15
Liste des tableaux.....	19
Liste des abréviations.....	21
Introduction.....	23
Partie 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES HÉMANGIOSARCOMES SPLÉNIQUES CANINS ET DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION ERG.....	27
I.    Connaissances fondamentales sur la rate du chien.....	27
A.    Anatomie.....	27
B.    Histologie.....	28
1.    Capsule et travées.....	29
2.    Vascularisation splénique.....	30
3.    Pulpe rouge.....	33
4.    Pulpe blanche.....	33
5.    Zone marginale.....	34
6.    Système lymphatique.....	35
C.    Physiologie et fonctions.....	35
1.    Hématopoïèse extra-médullaire.....	35
2.    Stockage du sang.....	36
3.    Filtration du sang.....	36
4.    Récupération et stockage du fer hémique.....	37
5.    Rôle immunitaire.....	37
D.    Conclusion.....	38
II.    Tumeurs vasculaires chez le chien : présentation et cas particulier des tumeurs vasculaires spléniques.....	39
A.    Hémangiome.....	40
1.    Définition et épidémiologie.....	40
2.    Aspect macroscopique.....	40
3.    Aspect microscopique.....	40
4.    Présentation clinique et exploration diagnostique.....	41
5.    Traitement et pronostic.....	41
B.    Hémangiosarcome.....	42
1.    Définition.....	42
a.    Cellules d'origine.....	42
b.    Éléments pathogéniques.....	43

c.	Croissance tumorale et dissémination .....	45
2.	Épidémiologie.....	46
a.	Âge et sexe des animaux atteints.....	46
b.	Influence de la race .....	47
c.	Autres facteurs prédisposants : infections et inflammations chroniques .....	47
3.	Aspect macroscopique .....	48
4.	Aspect microscopique .....	49
5.	Présentation clinique.....	51
6.	Exploration diagnostique.....	52
a.	Examens complémentaires permettant la visualisation directe de la tumeur et la réalisation d'un bilan d'extension .....	52
i.	Échographie abdominale.....	52
ii.	Radiographie.....	53
iii.	Examen tomodensitométrie .....	53
iv.	Bilan .....	53
b.	Examens complémentaires permettant d'évaluer l'impact de la tumeur sur le reste de l'organisme .....	54
c.	L'histologie : gold standard pour le diagnostic morphologique.....	55
7.	Traitements et données pronostiques .....	56
a.	Splénectomie .....	56
b.	Chimiothérapie adjuvante à la splénectomie.....	57
c.	Autres pistes thérapeutiques .....	59
i.	Chimiothérapie métronomique.....	59
ii.	Thérapies ciblées .....	59
iii.	Immunothérapie.....	60
d.	Facteurs influençant le pronostic .....	60
8.	Cas particulier : l'hémangioendothéliome .....	61
C.	Conclusion .....	62
III.	L'immunohistochimie comme outil diagnostique des hémangiosarcomes spléniques canins ; introduction du marqueur ERG.....	63
A.	Difficultés associées au diagnostic des tumeurs vasculaires spléniques .....	63
1.	Diagnostic différentiel des phénomènes pathologiques d'origine vasculaire .....	63
2.	Diagnostic différentiel de néoplasies d'origine différente .....	64
3.	Importance du diagnostic définitif .....	66
B.	Place de l'immunohistochimie dans le diagnostic des tumeurs .....	66
1.	Définition.....	66
2.	Marqueurs d'intérêt pour le diagnostic des hémangiosarcomes .....	67

a.	Factor VIII-related antigen.....	67
b.	CD31 .....	68
c.	CD34 .....	70
d.	Autres marqueurs.....	71
e.	Conclusion .....	72
C.	Le marqueur ERG, un outil potentiel de diagnostic des tumeurs vasculaires spléniques canines.....	73
1.	Présentation de la protéine ERG .....	74
a.	Famille des facteurs de transcription ETS .....	74
b.	Structure et isoformes d'ERG .....	74
c.	Expression de la protéine ERG.....	76
d.	Activation de la protéine ERG.....	77
e.	Fonction de la protéine ERG.....	77
f.	ERG et oncogénèse.....	78
2.	L'utilisation du marqueur ERG chez l'Homme.....	81
a.	Cartographie du marquage ERG dans les tissus sains .....	81
b.	Immunomarquages ERG dans différents types tumoraux .....	82
c.	Bilan : utilisation pratique d'ERG dans le diagnostic immunohistochimique des tumeurs vasculaires chez l'Homme.....	86
IV.	Conclusion .....	89
Partie 2 : ÉTUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE DE LA PROTÉINE ERG COMME MARQUEUR DES TUMEURS VASCULAIRES SPLÉNIQUES CANINES.....		
I.	Objectif de la thèse.....	91
II.	Matériel et méthode .....	93
A.	Comparaison des protéines ERG humaine et canine par bioinformatique.....	93
B.	Immunomarquages de tumeurs spléniques canines .....	93
1.	Sélection des cas inclus dans l'étude .....	93
a.	Première étape de sélection des cas : recensement dans les archives numériques disponibles, à partir du diagnostic établi, des cas d'intérêt.....	94
b.	Seconde étape de sélection des cas : observation des lames colorées en hémalum-éosine et choix du bloc en paraffine à utiliser prioritairement.....	94
2.	Réalisation des immunomarquages .....	96
a.	Principe général de l'immunohistochimie et système ABC.....	96
b.	Grandes étapes de l'immunomarquage.....	97
c.	Immunomarquages réalisés .....	100
3.	Méthode de lecture des immunomarquages.....	102
a.	Lecture des lames.....	102

b.	Analyse des résultats.....	103
III.	Résultats .....	105
A.	Comparaison des protéines ERG humaine et canine par bioinformatique.....	105
B.	Étude immunohistochimique de tumeurs spléniques canines .....	107
1.	Populations cellulaires normales marquées .....	107
a.	Immunomarquage avec un anticorps anti-ERG .....	108
b.	Comparaison avec CD31.....	108
2.	Tumeurs vasculaires .....	111
a.	Immunomarquage avec un anticorps anti-ERG .....	111
b.	Comparaison avec CD31.....	112
3.	Tumeurs stromales.....	114
4.	Tumeurs spléniques particulières ou rares .....	116
IV.	Discussion .....	119
A.	Discussion sur le matériel et la méthode .....	119
1.	Choix de l'anticorps anti-ERG et validation .....	119
a.	Choix de l'anticorps anti-ERG .....	119
b.	Validation par Western Blot.....	120
2.	Choix de la rate comme organe d'étude.....	121
3.	Plan expérimental de l'étude immunohistochimique.....	122
a.	Choix de l'anticorps anti-CD31 .....	122
b.	Aspect rétrospectif de l'étude et utilisation de blocs en paraffine.....	122
c.	Cas recrutés pour les immunomarquages.....	123
d.	Choix des témoins de marquage .....	124
e.	Méthode de lecture des immunomarquages.....	125
B.	Discussion sur les résultats.....	126
1.	Hétérogénéité architecturale et morphologique des tumeurs vasculaires .....	126
2.	Validité de l'anticorps anti-ERG pour identifier les cellules endothéliales spléniques de chien .....	126
a.	Sensibilité et spécificité du marquage sur les populations cellulaires spléniques normales.....	126
b.	Sensibilité et spécificité du marquage sur les tumeurs spléniques.....	128
i.	Sensibilité du marquage ERG pour les tumeurs vasculaires spléniques .....	128
ii.	Spécificité du marquage ERG .....	131
3.	Bilan : Application du marquage ERG au diagnostic immunohistochimique des tumeurs vasculaires spléniques canines.....	134
C.	Perspectives.....	136
Conclusion	.....	139

Bibliographie.....	141
Annexes .....	153



## Liste des annexes

Annexe 1 : Fiche fournisseur de l'anticorps anti-ERG.....	155
Annexe 2 : Fiche fournisseur de l'anticorps anti-CD31.....	160
Annexe 3 : Protocole de coloration spéciale au bleu de Toluidine.....	164
Annexe 4 : Alignement des séquences d'acides aminés des isoformes de la protéine ERG humaine.....	166
Annexe 5 : Alignement des séquences d'acides aminés des isoformes de la protéine ERG canine.....	168
Annexe 6 : Résultats des immunomarquages ERG et CD31 des tumeurs vasculaires spléniques.....	170
Annexe 7 : Résultats des immunomarquages ERG et CD31 des tumeurs initialement diagnostiquées tumeurs stromales spléniques.....	172
Annexe 8 : Résultats des immunomarquages ERG et CD31 des tumeurs spléniques rares ou particulières.....	176



## Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique d'une vue latérale gauche des organes abdominaux ....	29
Figure 2 : Représentation schématique des faces pariétale et viscérale de la rate de chien .....	30
Figure 3 : Représentation schématique de l'apparence histologique de la rate de chien .....	31
Figure 4 : Observation microscopique d'une rate de chien sain colorée en Hémalum-Éosine (HE) .....	31
Figure 5 : Représentation schématique du réseau vasculaire d'une rate normale de mammifère.....	32
Figure 6 : Observation microscopique d'une artériole centrale colorée en HE .....	33
Figure 7 : Observation microscopique d'un ellipsoïde splénique coloré en HE .....	33
Figure 8 : Représentation schématique et observation microscopique avec coloration HE d'un sinus veineux.....	34
Figure 9 : Observation microscopique du réseau veineux splénique coloré en HE.....	35
Figure 10 : Observation microscopique d'une rate de chien colorée en HE.....	35
Figure 11 : Observation microscopique d'une rate de chien colorée en HE.....	36
Figure 12 : Marqueurs cellulaires recherchés par <i>Kakiuchi-Kiyota et al. (2020)</i> dans des hémangiosarcomes canins.....	45
Figure 13 : Lésions macroscopiques d'hémangiosarcomes spléniques.....	50
Figure 14 : Observations microscopiques d'hémangiosarcomes spléniques canins colorés en HE.....	52
Figure 15 : Observation microscopique d'un sarcome stromal splénique de chien, coloré en HE.....	67
Figure 16 : Observation microscopique d'un hémangiosarcome épithélioïde cutané chez un chien, coloré en HE.....	67
Figure 17 : Observation microscopique d'un hémangiosarcome splénique canin après immunohistochimie avec un anticorps anti FVIII-RA.....	70
Figure 18 : Observation microscopique d'un angiosarcome humain localisé dans le foie, après IHC avec un anticorps anti-CD31.....	71
Figure 19 : Observation microscopique d'un hémangiosarcome splénique canin après IHC avec un anticorps anti-CD31.....	72
Figure 20 : Observation microscopique d'un hémangiosarcome du côlon chez un chat après IHC avec un anticorps anti-CD34.....	73
Figure 21 : Structure du gène <i>ERG</i> et des isoformes protéiques qu'il code.....	77
Figure 22 : Observation microscopique de tissus sains humains après IHC avec un anticorps anti-ERG.....	84

Figure 23 : Observation microscopique d'un hémangiome caverneux (gauche) et d'un hémangioendothéliome kaposiforme (droite) humains après IHC avec un anticorps anti-ERG.....	85
Figure 24 : Observation microscopique d'angiosarcomes humains après IHC avec un anticorps anti-ERG.....	85
Figure 25 : Observation microscopique de carcinomes prostatiques humains après IHC avec un anticorps anti-ERG.....	85
Figure 26 : Observation microscopique d'une leucémie myéloïde aiguë (gauche) et d'un sarcome d'Ewing (droite) humains après IHC avec un anticorps anti-ERG.....	86
Figure 27 : Observation microscopique d'un sarcome épithélioïde humain coloré en HE (gauche), et après IHC avec un anticorps anti-ERG (milieu) et anti-CD31 (droite).....	86
Figure 28 : Observation microscopique d'un méningiome fibreux humain après IHC avec un anticorps anti-ERG.....	87
Figure 29 : Représentation schématique des interactions entre chaque réactif intervenant dans le système ABC.....	99
Figure 30 : Automates utilisés pour le protocole d'immunohistochimie.....	102
Figure 31 : Alignement des séquences d'acides aminés des isoformes canine et humaine comprenant le plus de domaines conservés.....	108
Figure 32 : Alignement des séquences d'acides aminés des isoformes de la protéine ERG des espèces humaine et canine, dans la région C-terminale reconnue par l'anticorps anti-ERG.....	109
Figure 33 : Observation microscopique de portions de pulpe blanche de rates saines après IHC avec un anticorps anti-ERG (gauche) et anti-CD31 (droite).....	111
Figure 34 : Observation microscopique de portions de rates saines après IHC avec un anticorps anti-ERG (gauche) et anti-CD31 (droite), montrant des mégacaryocytes marqués.....	111
Figure 35 : Observation microscopique d'un HSA après IHC avec un anticorps anti-ERG, montrant des polynucléaires neutrophiles marqués.....	112
Figure 36 : Observation microscopique de portions de rates saines après IHC avec un anticorps anti-ERG (gauche) et anti-CD31 (droite), montrant un type vasculaire dont les cellules endothéliales sont positives pour ERG mais négatives pour CD31.....	112
Figure 37 : Observation microscopique de portions d'un nœud lymphatique après IHC avec un anticorps anti-ERG (gauche) et anti-CD31 (droite).....	112
Figure 38 : Observation microscopique d'un HSA splénique canin après IHC avec un anticorps anti-ERG.....	113
Figure 39 : Observation microscopique de trois HSAs spléniques canins après IHC avec un anticorps anti-ERG (gauche) et anti-CD31 (droite), montrant un marquage des cellules tumorales avec une intensité variable.....	115

Figure 40 : Observation microscopique de cellules tumorales d’HSA circulantes dans les espaces vasculaires spléniques, après IHC avec un anticorps anti-ERG (gauche) et anti-CD31 (droite).....	116
Figure 41 : Observation microscopique d’un sarcome stromal splénique après IHC avec un anticorps anti-ERG.....	117
Figure 42 : Observation microscopique d’un sarcome stromal splénique recatégorisé HSA, après IHC avec un anticorps anti- ERG (gauche) et anti-CD31 (droite).....	117
Figure 43 : Observation microscopique de tumeurs initialement classées comme tumeurs non vasculaires, mais recatégorisées HSAs au vu des marquages.....	119
Figure 44 : Observation microscopique d’un lymphome B (haut) et d’un lymphome T (bas) spléniques après IHC avec un anticorps anti-ERG (gauche) et anti-CD31 (droite).....	120
Figure 45 : Observation microscopique d’un mastocytome splénique après IHC avec un anticorps anti-ERG (gauche) et coloration au bleu de toluidine (droite).....	120
Figure 46 : Observation microscopique d’un vaisseau de morphologie représentative de la population de vaisseaux aux cellules endothéliales ERG-positives et CD31-négatives, en coupe longitudinale, après IHC avec un anticorps anti-CD31.....	129
Figure 47 : Observation microscopique d’une tumeur vasculaire ERG-positive et CD31-négative, après IHC avec un anticorps anti-ERG.....	131



## Liste des tableaux

Tableau I : Âge moyen des chiens diagnostiqués d'hémangiosarcome splénique .....	48
Tableau II : Répartition des sexes parmi les cas d'hémangiosarcomes spléniques .....	48
Tableau III : Médianes de survie des chiens atteints d'HSA splénique traités par splénectomie seule.....	59
Tableau IV : Médianes de survie des chiens atteints d'HSA splénique traités par splénectomie et chimiothérapie adjuvante.....	59
Tableau V : Comparaison des marqueurs endothéliaux utilisés dans le diagnostic immunohistochimique des hémangiosarcomes canins.....	75
Tableau VI : Positivité de différents types tumoraux après immunomarquage avec un anticorps anti-ERG chez l'Homme, d'après trois principales études préliminaires.....	88
Tableau VII : Nombre final de cas inclus dans l'étude, par catégories de tumeurs.....	98
Tableau VIII : Anticorps utilisés pour les immunomarquages : Références, pH des tampons de démasquage et facteurs de dilution.....	103
Tableau IX : Isoformes de la protéine ERG chez l'Homme et le chien.....	107
Tableau X : Résultats des marquages ERG et CD31 des tumeurs vasculaires.....	113
Tableau XI : Résultats des marquages ERG et CD31 des tumeurs stromales.....	116
Tableau XII : Résultats des marquages ERG et CD31 des tumeurs spléniques particulières ou rares.....	118



## Liste des abréviations

°C : Degrés Celsius

ABC : Complexe avidine-biotine-peroxydase (Avidin-biotin complex)

AC : Adriamycine (= Doxorubicine), Cyclophosphamide

AR : Récepteur des androgènes (Androgen receptor)

AT III : Antithrombine III

CD : Cluster de différenciation

CIVD : Coagulation intra-vasculaire disséminée

CRCL : Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

CRPC : Cancer prostatique résistant à la castration

CXCL : Chemokine (CXC motif) Ligand

CXCR : Chemokine (CXC motif) Receptor

eBAT : Epidermal growth factor Bispecific Angiotoxin

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

EGFR : Epidermal growth factor receptor

EMT : Transition épithélio-mésenchymateuse (Epithelial-mesenchymal transition)

env. : Environ

ERG : E-26 transformation specific-related gene

ETS : E-26 transformation specific

EWS : Ewing sarcoma protein

EZH2 : enhancer of zeste homolog 2

Fc : Fragment cristallisable

FFPE : Formalin-fixed paraffin-embedded

FLI-1 : Friend leukemia integration-1

FVIII-RA : Factor VIII-related antigen

HE : Hémalum-Éosine

HSA : Hémangiosarcome

HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells

ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule

IgM : Immunoglobulines M

IHC : Immunohistochimie

IL-8 : Interleukine 8

kb : kilobases

kDa : kiloDaltons

LAPVSO : Laboratoire d'Anatomie Pathologique Vétérinaire du Sud-Ouest  
LPS : Lipopolysaccharide  
LYVE-1 : Lymphatic vessel endothelial receptor-1  
MAP kinases : mitogen-activated protein kinases  
MAPK/ERK : Mitogen activated protein kinase/Extracellular signal-regulated kinase  
MLPA : Manchon lymphoïde péri-artériolaire  
MTP-PE : Muramyl tripeptide-phosphatidylethanolamine  
N.S. : Non significatif  
NB : *Nota Bene*  
NFS : Numération et formule sanguine  
Obj. : Objectif (grossissement)  
PAI-1 : Inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1  
PBS : Tampon phosphate salin (Phosphate-buffered saline)  
PDF : Produits de dégradation de la fibrine  
PDGFR-2 : Platelet-derived growth factor receptor-2  
PECAM-1 : Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1  
PFI : Progression-Free Interval  
PI3K/AKT/mTOR : phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/mammalian target of the rapamycin  
PIN : Néoplasie prostatique intraépithéliale (Prostatic intraepithelial neoplasia)  
PNT (domaine) : Domaine pointu  
PROX-1 : prospero-related homeobox gene-1  
RTK : Récepteur tyrosine kinase  
siRNA : small interfering ribonucleic acid  
TMPRSS2 : transmembrane protease serine 2  
TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor  $\alpha$   
uPAR : Urokinase plasminogen activator receptor  
VAC : Vincristine, Adriamycine (= Doxorubicine), Cyclophosphamide  
VCAM : Vascular cell adhesion protein  
VE-cadhérine ou VE-cadherin : Vascular Endothelial-Cadherin  
VEGF : Vascular endothelial growth factor  
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor  
WB : Western Blot

# INTRODUCTION

Depuis sa première utilisation dans les années 1940 (Childs, 2014; Packer, 2021), l'immunohistochimie (IHC) est progressivement devenue un outil incontournable, complémentaire de l'histologie, dans le diagnostic de maladies humaines et animales. Cette technique, faisant appel à des anticorps couplés à un générateur de signal (le plus souvent un précipité insoluble), permet de localiser un antigène d'intérêt au sein d'une coupe de tissu.

L'utilisation d'un anticorps dans un protocole d'IHC à visée diagnostique nécessite de vérifier certaines caractéristiques, parmi lesquelles l'affinité de l'anticorps pour l'antigène ciblé, sa spécificité pour celui-ci, ainsi que les types cellulaires sains et tumoraux usuellement marqués par l'anticorps en IHC. Cette vérification doit se baser sur des études immunologiques et l'observation du marquage de nombreux tissus sains et tumoraux. (Lin and Chen, 2014) En médecine vétérinaire, les anticorps utilisés pour des immunomarquages sont souvent des anticorps initialement développés pour la reconnaissance d'antigènes humains, à condition que leurs cibles biologiques se ressemblent. C'est heureusement fréquemment le cas, du fait de la proximité génétique de ces deux espèces. À titre d'exemple, l'anticorps monoclonal MIB-1, permettant de détecter le facteur de prolifération Ki-67 chez l'Homme, a vu son utilisation validée chez le chien il y a 25 ans. (Laprie *et al.*, 1998) La validation d'un anticorps anti-antigène humain sur des tissus canins passe par la réponse aux questions suivantes : Existe-t-il une réaction croisée de l'anticorps vers le même antigène dans l'espèce canine ? Cette réaction est-elle spécifique ? L'IHC donne-t-elle des résultats similaires à ceux observés chez l'Homme ? Sinon, quelles sont les particularités de l'espèce canine par rapport à ce marquage ?

En cancérologie, les intérêts des immunomarquages sont multiples : déterminer le type cellulaire à l'origine d'une tumeur, identifier des cibles thérapeutiques ou encore préciser le pronostic. Ces derniers constituent donc une technique précieuse pour les pathologistes.

Les hémangiosarcomes (HSAs) sont des tumeurs malignes provenant des cellules endothéliales tapissant la paroi interne des vaisseaux sanguins. Ces tumeurs existent dans les espèces humaine et canine, avec cependant quelques spécificités. Chez le chien, les HSAs représentent jusqu'à 3 % de l'ensemble des tumeurs (Clifford *et al.*, 2000; Pinello *et al.*, 2022), et sont associés à un comportement agressif, des métastases rapides et un pronostic sombre. Parmi les organes où siège préférentiellement cette tumeur, la rate est fréquemment atteinte. Le diagnostic de cette maladie passe par une analyse histologique de la masse après son exérèse. Cependant, l'observation microscopique s'avère parfois complexe et des immunomarquages peuvent être nécessaires afin de confirmer l'origine endothéliale des cellules tumorales.

La protéine ERG (E-26 transformation specific-related gene), un facteur de transcription de la famille des facteurs ETS (E-26 transformation specific), est exprimée chez l'Homme dans les cellules endothéliales et dans des cellules hématopoïétiques. Elle est utilisée comme cible en IHC dans cette espèce, afin de détecter les vaisseaux sanguins, les tumeurs endothéliales, mais aussi les tumeurs prostatiques, dans lesquelles ERG est retrouvée surexprimée dans la moitié des cas. Le marquage des cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins, qu'elles soient saines ou tumorales, par un anticorps anti-ERG est associé à une sensibilité importante et à une lisibilité aisée, faisant de cet outil l'un des plus utilisés en médecine humaine pour reconnaître ces cellules.

L'immunomarquage ERG n'est à ce jour pas validé dans l'espèce canine. Or, les marqueurs de l'endothélium actuellement disponibles dans cette espèce ne sont pas entièrement satisfaisants. Un marqueur avec une fiabilité similaire à celle d'ERG dans l'espèce humaine serait donc utile pour l'amélioration de la prise en charge de ces tumeurs chez le chien. Ainsi, le projet de la présente thèse a été de déterminer si un anticorps ciblant la protéine ERG humaine pouvait être utilisé pour reconnaître la protéine ERG canine, et si cette reconnaissance pouvait être exploitée dans le diagnostic immunohistochimique des tumeurs endothéliales spléniques chez le chien.

Afin de mieux comprendre les manipulations réalisées, une première partie bibliographique s'attache d'abord à présenter la rate, organe où siègent les tumeurs étudiées dans ce projet, puis les tumeurs vasculaires spléniques et leurs enjeux, notamment diagnostiques. Ensuite, les marqueurs endothéliaux actuellement disponibles chez le chien seront introduits, de même que la protéine ERG et son utilisation comme marqueur en IHC chez l'Homme. Dans une seconde partie, les manipulations réalisées ainsi que les résultats obtenus seront présentés, avant de discuter des différents éléments entrant en compte dans la formulation de la réponse à la question posée : L'immunohistochimie avec un anticorps anti-ERG peut-elle faciliter le diagnostic des tumeurs vasculaires spléniques canines ?





# PARTIE 1

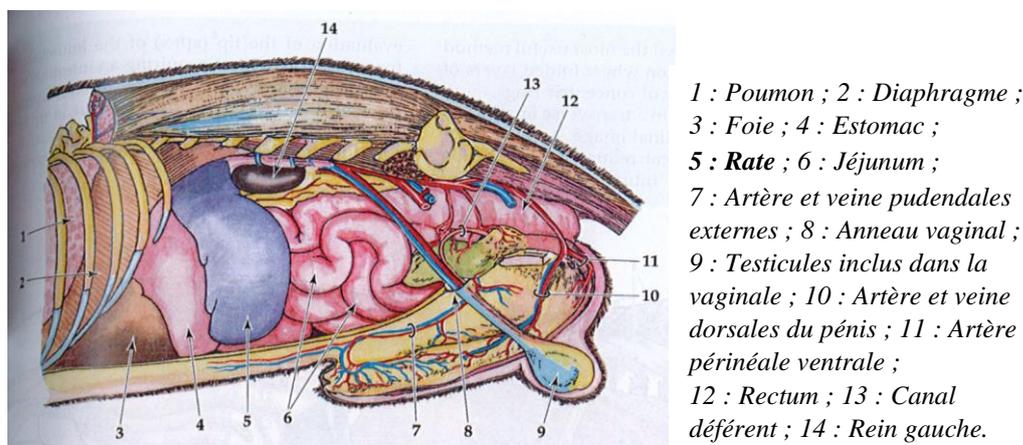
## ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES HÉMANGIOSARCOMES SPLÉNIQUES CANINS ET DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION ERG

### I. Connaissances fondamentales sur la rate du chien

#### A. Anatomie

La rate est un organe abdominal parenchymateux encapsulé, de couleur rouge clair à brune et de forme allongée chez le chien. (Barone, 2009; McMillan and Harris, 2018; König and Liebich, 2020) Suivant la race, son poids varie de cinq à 130 grammes, sa longueur de huit à 30 centimètres et sa largeur maximale de trois à huit centimètres. (Barone, 2009)

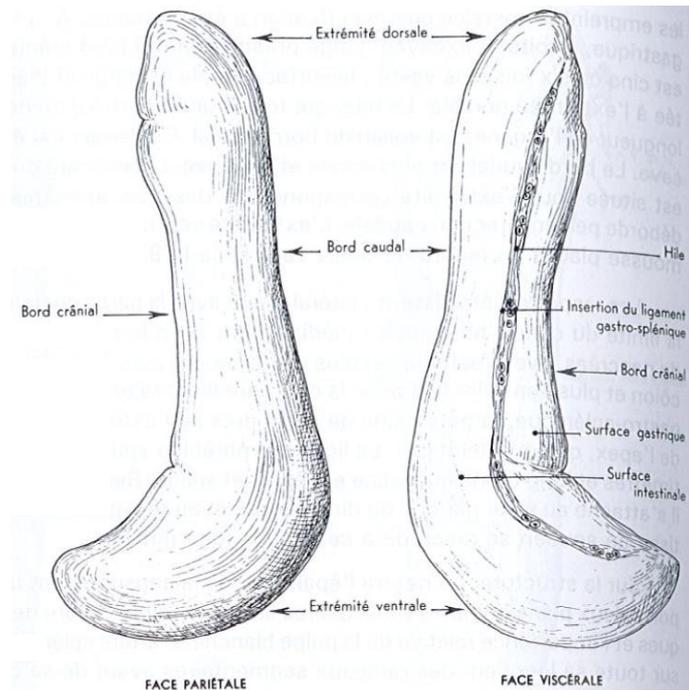
Entièrement intra-péritonéale, la rate se situe caudalement au diaphragme, dans la portion crâniale gauche de l'abdomen. (König and Liebich, 2020) Elle est reliée à la grande courbure de l'estomac par le ligament gastro-splénique, qui est mince et large, et son extrémité dorsale est attachée au pilier gauche du diaphragme par le ligament phrénico-splénique. La laxité de ses ligaments autorise à la rate canine une mobilité importante, et sa position est notamment amenée à varier suivant l'état de réplétion de l'estomac. Lorsque ce dernier est vide, elle peut être entièrement sous-costale, mais s'il se remplit, elle est repoussée caudalement, notamment sa partie distale, qui peut se déplacer sous la paroi du flanc et induire un positionnement horizontal de l'organe. (Barone, 2009; Valli *et al.*, 2016) La position de la rate au sein de l'abdomen, dans le cas où l'estomac est vide, est représentée dans la figure 1. L'anatomie de la rate, notamment sa localisation périphérique dans l'abdomen, ses attaches mésentériques lâches et son pédicule vasculaire relativement long rendent l'abord chirurgical de l'organe et la splénectomie relativement aisés. (Spangler and Kass, 1997)



**Figure 1 : Représentation schématique d'une vue latérale gauche des organes abdominaux.**

L'image montre la position antérieure gauche de la rate (en bleu) dans la cavité abdominale, ainsi que sa localisation contre la grande courbure de l'estomac. (Source : Kumar, 2015)

La rate présente deux faces, comme l'illustre la figure 2 : une face diaphragmatique (ou pariétale), au contact du diaphragme, et une face viscérale, médiale. Situé sur sa face viscérale, le hile est une région allongée où pénètrent et sortent respectivement l'artère et la veine spléniques, ainsi que d'autres structures vasculaires, les vaisseaux lymphatiques efférents et les structures nerveuses autonomes, permettant l'irrigation et l'innervation de l'organe. (Kumar, 2015; McMillan and Harris, 2018; König and Liebich, 2020) Il s'agit également de la région d'insertion du grand omentum et du ligament gastro-splénique. (Valli et al., 2016)



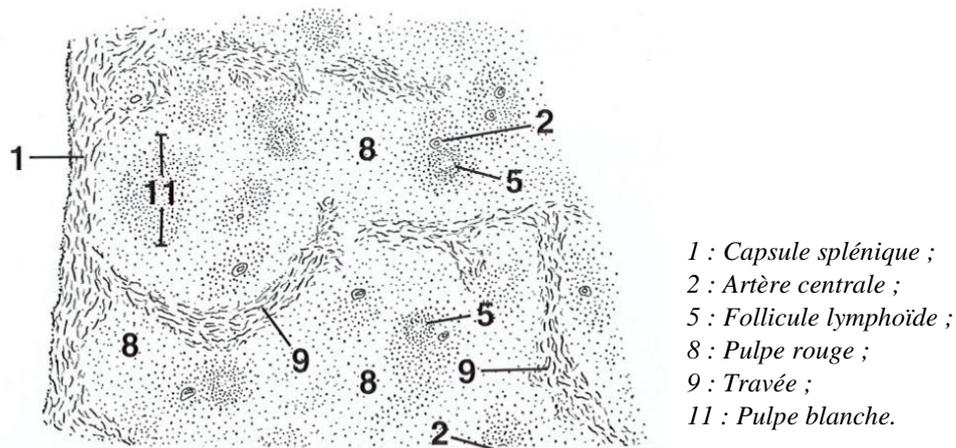
**Figure 2 : Représentation schématique des faces pariétale et viscérale de la rate de chien.**

L'image montre le hile, région longitudinale par laquelle pénètrent les structures vasculaires et sur laquelle s'insèrent les attaches de l'organe, sur la face viscérale. (D'après Barone, 2009)

À la section, il est parfois possible de distinguer macroscopiquement plusieurs structures. Une capsule enveloppe l'organe et se prolonge en travées dans le parenchyme. Ce dernier contient la pulpe rouge, formant des zones rouge foncé et sanguines entourant la pulpe blanche, plus claire. Ces deux types de tissus se distinguent non seulement par une composition histologique différente mais aussi par des fonctions distinctes. (Valli *et al.*, 2016)

## B. Histologie

La rate est un organe d'architecture complexe, composé de tissus parenchymateux de compositions et de fonctions distinctes, que sont la pulpe rouge, la pulpe blanche et la zone marginale, cohabitant au sein d'une capsule fibro-musculaire et reliés par un système vasculaire spécifique. Un schéma général de l'apparence histologique de la rate canine est représenté dans la figure 3. Il est suivi d'une description détaillée des structures qui la composent.

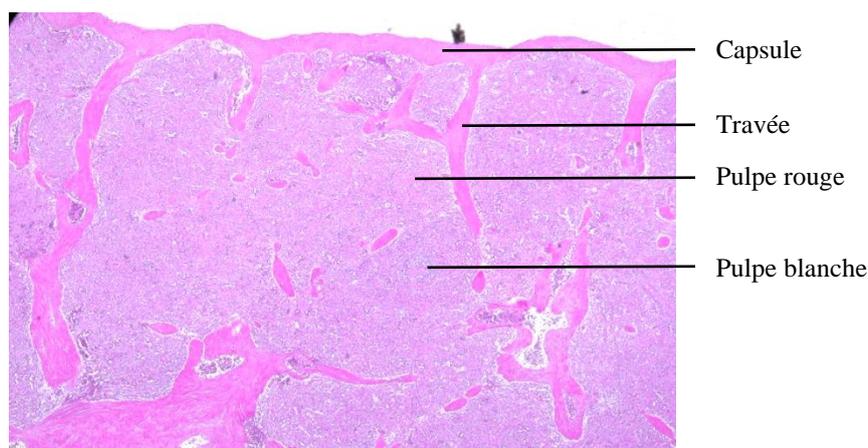


**Figure 3 : Représentation schématique de l'apparence histologique de la rate de chien.** La capsule splénique englobe l'organe parenchymateux composé d'une pulpe blanche, d'une pulpe rouge, et d'un réseau vasculaire complexe. (Source : Bacha and Bacha, 2012)

### 1. Capsule et travées

La rate est entièrement enveloppée d'une capsule composée d'un tissu conjonctif au sein duquel est intercalé un nombre important de cellules musculaires lisses, ayant une fonction contractile. (Figure 4) Plus précisément, il s'agit de myofibroblastes car, en plus de cette capacité de contraction rapide, ces cellules produisent des fibres du tissu conjonctif composant la capsule. (McMillan and Harris, 2018) La capsule splénique est également riche en fibres élastiques, favorisant les modifications de taille de l'organe. (Bacha and Bacha, 2012) Sa surface externe est recouverte par le feuillet viscéral du péritoine. (McMillan and Harris, 2018)

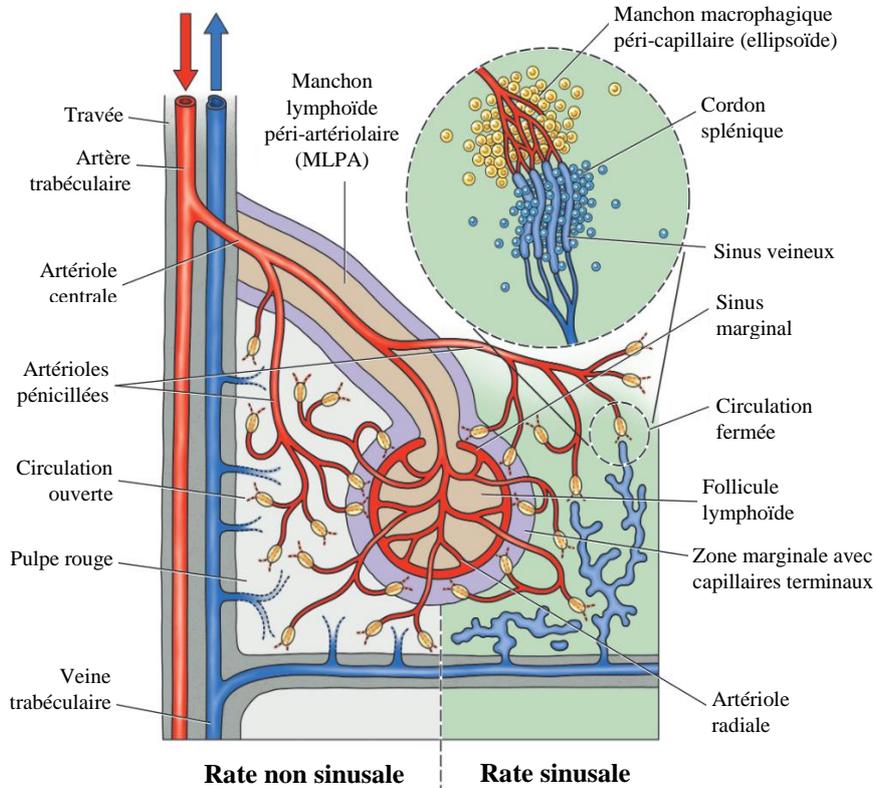
À partir de cette capsule fibro-musculaire, des travées puis des trabécules, plus petites, s'étendent en direction centripète, parfois jusqu'à la face opposée de l'organe. (Figure 4) Celles-ci constituent la charpente fibreuse de l'organe, servant de matrice au parenchyme splénique. (Barone, 2009; McMillan and Harris, 2018)



**Figure 4 : Observation microscopique d'une rate de chien sain colorée en Hémalum-Éosine (HE).** La capsule splénique entoure l'organe et produit des travées qui s'enfoncent dans le parenchyme. Obj. x60. (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

## 2. Vascularisation splénique

L'artère splénique, provenant de l'artère coeliaque, pénètre dans la rate au niveau du hile puis se ramifie en artères trabéculaires dans les travées issues de la capsule splénique. La suite du réseau vasculaire est représentée sur la figure 5 et son organisation est expliquée ci-dessous.

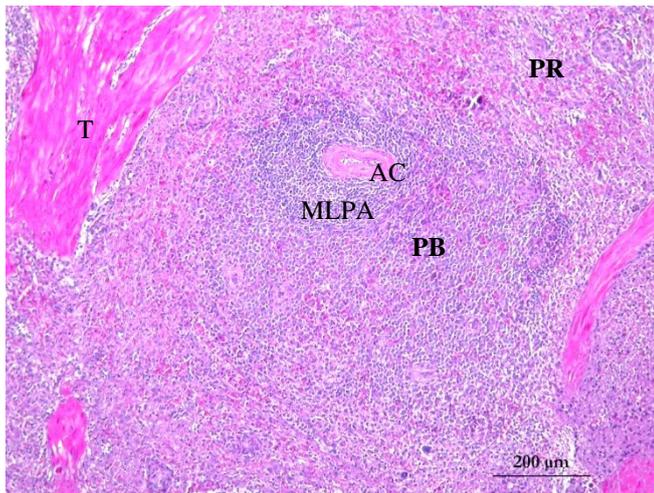


**Figure 5 : Représentation schématique du réseau vasculaire d'une rate normale de mammifère.** À gauche, une rate non-sinusale telle qu'observée dans la majorité des espèces domestiques, et à droite une rate sinusale telle que présente chez le chien. (D'après Valli *et al.* 2016)

Lorsqu'elles se séparent des travées, les artères s'enveloppent d'un tissu lymphoïde appelé manchon lymphoïde péri-artériolaire (MLPA), un des composants de la pulpe blanche. Elles sont alors appelées artérioles centrales. (Figure 6)

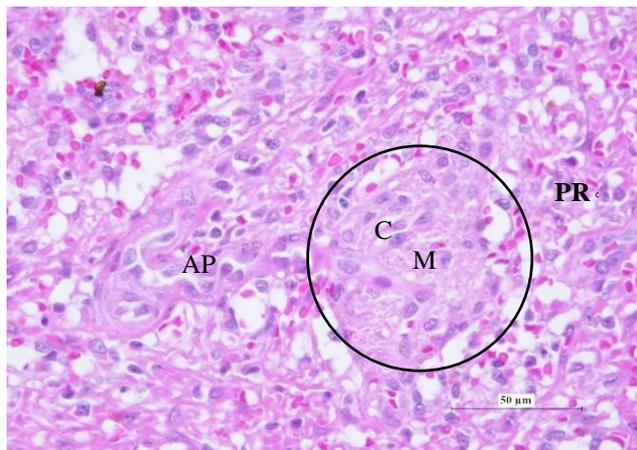
À partir d'une artériole centrale, des vaisseaux se ramifient en direction des follicules lymphoïdes spléniques, une autre structure appartenant à la pulpe blanche, et forment un lit capillaire leur offrant, d'une part, une perfusion, et d'autre part un apport d'antigènes transportés par le sang, permettant la fonction immunitaire de la rate. Ces capillaires folliculaires se poursuivent en artérioles radiales qui s'anastomosent en sortie des follicules lymphoïdes, à la jonction avec la pulpe rouge, et forment les sinus marginaux. Ces derniers sont caractérisés par une couverture endothéliale non complètement jointive dans leur portion distale, autorisant le flux sanguin à passer à travers leur paroi, pénétrant ainsi dans la zone marginale. Le sang chemine ensuite de la zone marginale vers la pulpe rouge.

Outre les ramifications venant d'être détaillées, l'artériole centrale donne également naissance à des artérioles pénicillées quittant la pulpe blanche et se ramifiant en capillaires. Ces capillaires sont par endroits entourés de macrophages, contenus par un réseau de fibre de réticuline. L'association d'un capillaire et de sa gaine de macrophages est nommée ellipsoïde. (Figure 7) (Bacha and Bacha, 2012; Valli *et al.*, 2016; McMillan and Harris, 2018; König and Liebich, 2020)



AC : Artériole centrale ;  
MLPA : Manchon lymphoïde  
péri-artériolaire ;  
PR : Pulpe rouge ;  
PB : Pulpe blanche ;  
T : Travée

**Figure 6 : Observation microscopique d'une artériole centrale colorée en HE.** L'artériole centrale (AC) est encerclée par un amas de lymphocytes formant un manchon lymphoïde péri-artériolaire (MLPA). (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

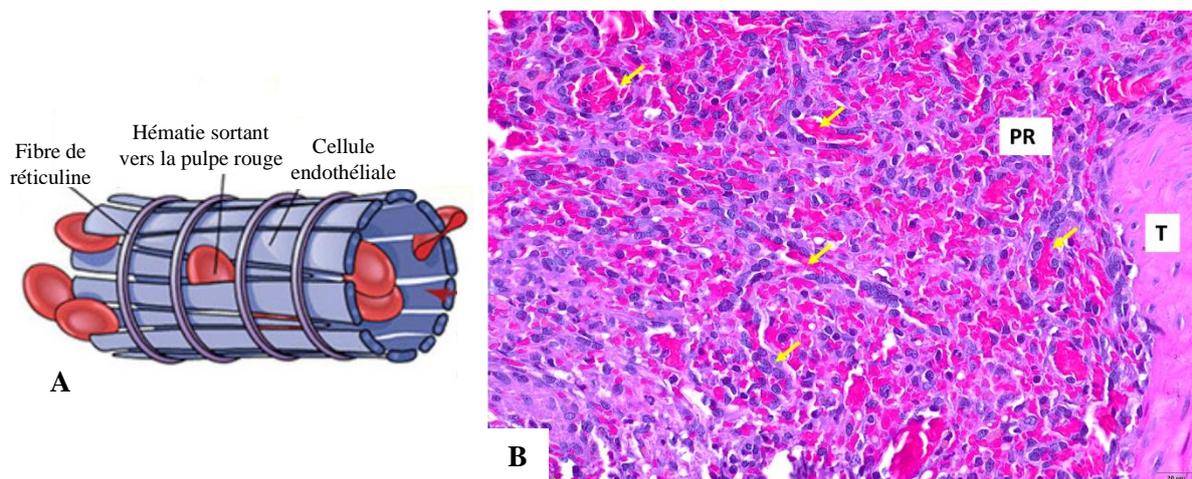


C : Capillaire ;  
M : Macrophage ;  
AP : Artériole pénicillée ;  
PR : Pulpe rouge

**Figure 7 : Observation microscopique d'un ellipsoïde splénique coloré en HE.** L'ellipsoïde (encerclé) comprend des vaisseaux capillaires (C) bordés de cellules endothéliales, entourés de cellules phagocytaires de type macrophagiques (M). Sur la coupe, une artériole pénicillée (AP) rejoignant le réseau capillaire est visible. L'ensemble est localisé dans la pulpe rouge (PR). (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

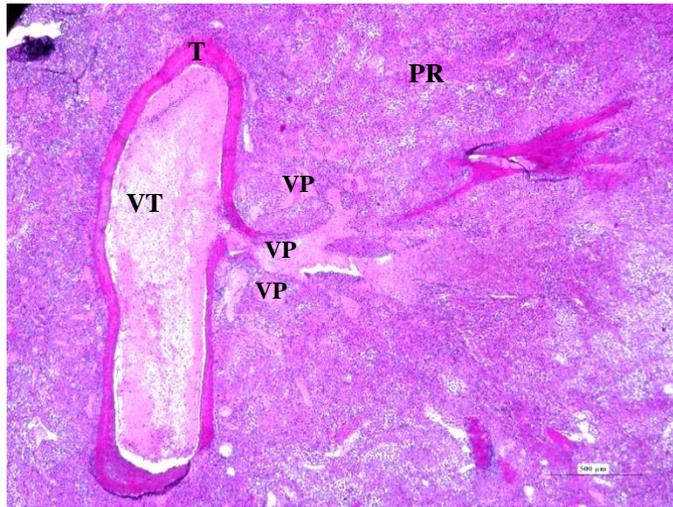
À la suite de ces capillaires, deux types d'organisations sont possibles et cohabitent chez le chien, dont la rate est qualifiée de sinusale (Bacha and Bacha, 2012; Valli *et al.*, 2016; McMillan and Harris, 2018; Dao *et al.*, 2021) :

- ❖ La première, appelée **circulation ouverte**, est observable chez tous les animaux domestiques dont le chien et se définit par la présence de capillaires terminaux prolongeant les vaisseaux péricillés, et débouchant directement dans la pulpe rouge.
- ❖ La **circulation fermée**, spécifique de certaines espèces dont le chien, se caractérise par la présence de sinus veineux, des espaces vasculaires constitués de cellules endothéliales orientées longitudinalement, non entièrement jointives et formant une paroi discontinue. Ces cellules endothéliales sont contenues par une membrane basale elle aussi discontinue, composée de fibres de réticuline disposées en anneaux, à la manière d'un cerclage autour d'un tonneau. L'organisation des sinus veineux et leur apparence sur une coupe histologique sont représentées dans la figure 8. Les sinus veineux relient les capillaires péricillés au réseau veineux, d'où la qualification de système fermé, mais l'absence d'étanchéité de leur paroi vasculaire permet à une partie des érythrocytes et autres cellules sanguines de la traverser, et ainsi de rejoindre le réseau réticulé de la pulpe rouge.



**Figure 8 : Représentation schématique et observation microscopique avec coloration HE d'un sinus veineux.** A : Les cellules endothéliales tapissant le sinus sont contenues par des fibres de réticuline disposées comme un cerclage de tonneau. L'ensemble forme une paroi vasculaire lâche pouvant être traversées par des hématies. (Modifié d'après Dao *et al.*, 2021) B : Présence de nombreux sinus veineux (flèches jaunes) dans la pulpe rouge. Obj. x40 T : Travée ; PR : Pulpe rouge. (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

Le drainage sanguin de la rate est effectué par les veines pulpaires dans lesquelles se jette le sang issu de la pulpe rouge et des sinus veineux. Elles se poursuivent par les veines trabéculaires suivant les travées conjonctives (Figure 9) avant de s'anastomoser pour former la veine splénique, qui rejoint la veine porte. (Valli *et al.*, 2016; König and Liebich, 2020)

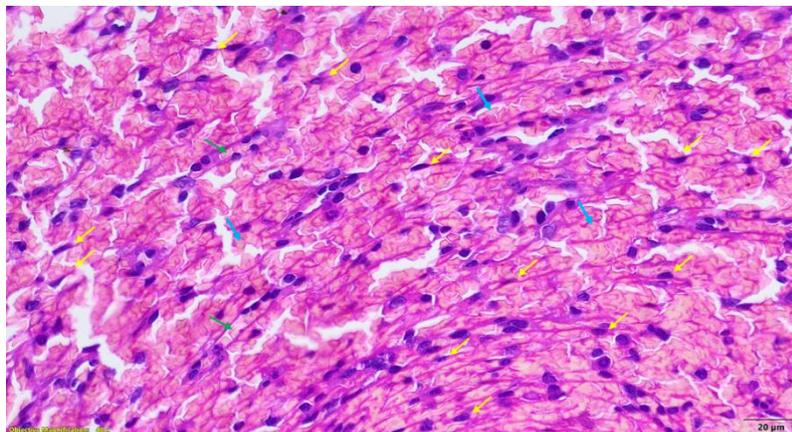


VP : Veine pulpaire ;  
 VT : Veine trabéculaire ;  
 T : Travée ;  
 PR : Pulpe rouge

**Figure 9 : Observation microscopique du réseau veineux splénique coloré en HE.** Plusieurs veines pulpaire rejoignent une travée pour former une veine trabéculaire. (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

### 3. Pulpe rouge

La pulpe rouge, qui s'étend diffusément dans toute la rate, est composée chez le chien des sinus veineux précédemment décrits, entre lesquels s'organise un réseau tridimensionnel formé par des fibres de réticuline produites par les cellules réticulées. (Figure 10) Cet ensemble forme les cordons spléniques, anciennement nommés cordons de Billroth. Ceux-ci servent de support à de nombreuses cellules, notamment des macrophages. Au sein de ce réseau chemine lentement le sang déversé dans la pulpe rouge via la circulation ouverte, permettant sa filtration par les macrophages. (Valli *et al.*, 2016; Reece and Rowe, 2017; McMillan and Harris, 2018)



**Figure 10 : Observation microscopique d'une rate de chien colorée en HE.** Les cellules réticulées (flèches jaunes) forment un réseau dans la pulpe rouge, dans lequel circulent librement de nombreuses hématies (flèches bleues). Des sinus veineux sont également présents (flèches vertes). Obj. x40 (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

### 4. Pulpe blanche

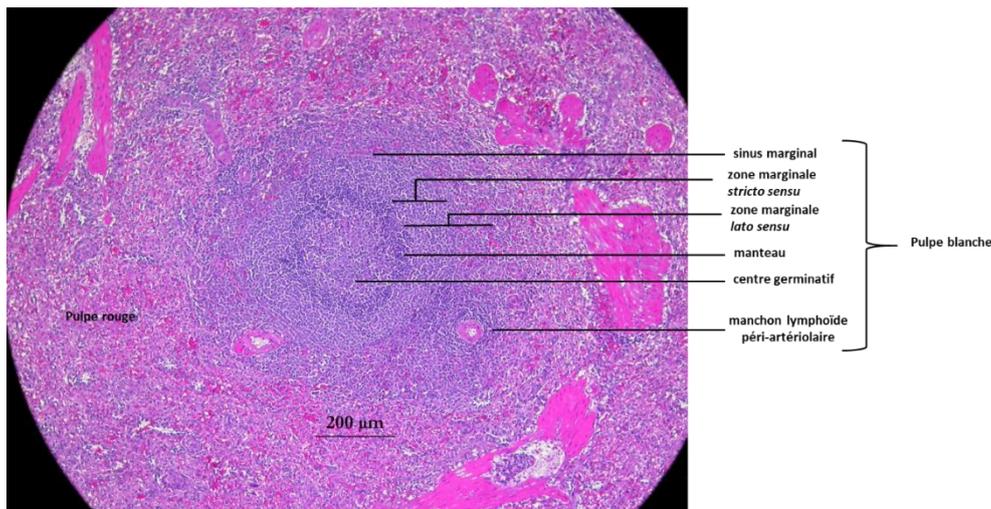
La pulpe blanche correspond au tissu lymphoïde réparti dans l'ensemble de l'organe. Elle compte ainsi les manchons lymphoïdes péri-artériolaires qui entourent les artérioles centrales, et les follicules lymphoïdes dispersés dans la rate, en périphérie mais dans la continuité des MLPA. (Bacha and Bacha, 2012; Valli *et al.*, 2016; McMillan and Harris, 2018)

Les manchons lymphoïdes péri-artériolaires (Figure 6) sont constitués en majorité de lymphocytes T CD4+, associés à une proportion plus faible d'autres lymphocytes T et B et de macrophages. Ces cellules sont amenées à réagir lors de la stimulation par un antigène et il est alors possible d'observer de nombreux plasmocytes dans leur périphérie.

Les follicules lymphoïdes spléniques ont une structure similaire à ceux retrouvés dans les nœuds lymphatiques. Ils comprennent principalement des cellules dérivées des lymphocytes B. Au repos, ces structures sont uniformes, mais lors d'une stimulation antigénique, les réactions cellulaires sont à l'origine de la différenciation d'un centre germinatif, dans lequel les lymphocytes B croissent et mûrissent. Le centre germinatif comprend une zone sombre composée de centroblastes, des cellules B ayant des capacités de division rapide, et une zone claire contenant des centrocytes, c'est-à-dire une population de lymphocytes B non proliférants issus des centroblastes, des lymphocytes T CD4+, des cellules dendritiques et des macrophages. La zone claire est le lieu de formation de lymphocytes B mémoires. Autour du centre germinatif s'étend la zone du manteau, où sont situés des petits lymphocytes B matures, mais naïfs et inactifs. (Figure 11) (Valli *et al.*, 2016; Tizard, 2018)

### 5. Zone marginale

En périphérie des follicules spléniques se trouve la zone marginale. La zone marginale au sens strict comprend uniquement des cellules de la zone marginale (cellules moyennes macronucléolées chez le chien), alors que la zone marginale au sens large correspond à la région qui sépare la pulpe blanche de la pulpe rouge. (Figure 11) Cette dernière est composée des sinus marginaux décrits précédemment, issus des artères centrales, entourés d'un réseau de cellules réticulées et de fibres de réticuline sur lesquelles reposent surtout des macrophages et des lymphocytes B, mais aussi des lymphocytes T et des cellules dendritiques. Cette région assure la captation des antigènes par les cellules immunocompétentes. (Valli *et al.*, 2016)



**Figure 11 : Observation microscopique d'une rate de chien colorée en HE.** La pulpe blanche splénique, comprenant ici un follicule et un MLPA, est bordée par la zone marginale qui la sépare de la pulpe rouge. Obj. x4 (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

## 6. Système lymphatique

La rate ne comprend pas de vascularisation lymphatique afférente. (Valli *et al.*, 2016) En revanche, un drainage lymphatique est permis par des vaisseaux lymphatiques efférents. Ceux-ci suivent les travées jusqu'au hile, avant de rejoindre les nœuds lymphatiques spléniques localisés à proximité. La lymphe est ensuite déversée dans le tronc cœliaque et rejoint la circulation lymphatique générale. (Barone, 2009; König and Liebich, 2020)

## C. Physiologie et fonctions

La rate est un organe assigné à de nombreuses fonctions, parmi lesquelles on compte le stockage et la filtration du sang, le stockage de fer, ainsi qu'un rôle immunitaire et hématopoïétique. (Valli *et al.*, 2016; Reece and Rowe, 2017; Cruz Cardona *et al.*, 2020) Les paragraphes suivants présentent ces différentes fonctions.

### 1. Hématopoïèse extra-médullaire

La rate est un organe hématopoïétique crucial lors de l'embryogenèse, mais elle perd progressivement cette fonction, celle-ci étant déplacée dans la moelle osseuse au cours du développement fœtal. Cependant, lors de besoins augmentés en cellules sanguines ou de défaut de production de ces cellules par la moelle osseuse, la rate devient le siège d'une hématopoïèse qualifiée d'extramédullaire. Ce processus résulte de l'activation cytokinique de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes circulant en très faible proportion dans le sang. Ces cellules migrent alors dans des sites embryonnaires d'hématopoïèse, dont les parenchymes hépatique et splénique, notamment la pulpe rouge, et prolifèrent. (Valli *et al.*, 2016)

Ce phénomène est communément retrouvé à un faible niveau chez des chiens sains, mais il peut devenir important et étendu chez des chiens atteints d'anémie chronique, de maladie respiratoire ou cardiovasculaire chronique, de septicémie ou encore de maladie infiltrative de la moelle osseuse. Lors d'extension importante de ce processus, la morphologie de la rate est modifiée, et une splénomégalie diffuse ou des nodules multifocaux sont visibles. À l'histologie, toutes les lignées hématopoïétiques sont présentes, en proportions parfois différentes. Les cellules de la lignée mégacaryocytaire sont les plus faciles à repérer compte tenu de leur taille et de leur morphologie ; les lignées érythroïde et granuleuse sont également fréquemment présentes, sous forme d'amas. L'identification des différents stades cellulaires de ces lignées sur une coupe histologique est mal aisée. (Valli *et al.*, 2016; Johnston and Tobias, 2018)

## 2. Stockage du sang

Le sang reçu par la rate via l'artère splénique transite dans la vascularisation de l'organe jusqu'aux sinus veineux de la pulpe rouge, où s'accumulent les cellules sanguines, notamment des érythrocytes et des plaquettes, permettant ainsi leur stockage. (Reece and Rowe, 2017) Ce stockage peut également être observé dans le maillage des cellules réticulées (partie ouverte de la circulation). La fonction de réservoir de la rate est notamment permise par la présence importante chez le chien de fibres élastiques au sein de la capsule et des travées, qui permettent une expansion de l'organe et une augmentation de sa contenance. Ainsi, 10 à 30 % du volume sanguin total peuvent être stockés dans le parenchyme splénique (Noroy, 2003; Valli *et al.*, 2016), contenant alors 10 à 20 % des globules rouges et 30 % de la masse plaquettaire de l'organisme (Johnston and Tobias, 2018).

Lorsque l'organisme est confronté à une demande accrue en globules rouges, par exemple lors d'hypoxie, d'hémorragie, de stress ou d'effort physique importants, une contraction de l'organe permet le relargage de cellules sanguines dans le système cardiovasculaire, pouvant ainsi faire monter l'hématocrite à plus de 50 %, soit dans la partie haute des valeurs physiologiques, comprises entre 40 et 56 %. L'hématocrite peut ainsi atteindre 1,5 fois la valeur initiale de l'animal. (Harvey, 2012; Reece and Rowe, 2017) Cette splénocontraction est rendue possible par l'activité contractile des cellules réticulées qui contiennent de nombreux filaments d'actine lisse dans leur cytoplasme, et des myofibroblastes présents dans la capsule et les travées, dont la contraction est régulée par le système nerveux autonome en réponse à la libération de catécholamines dans l'organisme. (Valli *et al.*, 2016; Reece and Rowe, 2017)

## 3. Filtration du sang

Certains éléments présents dans le sang et ayant potentiellement un effet délétère sur l'organisme, tels que les érythrocytes sénescents, défectueux ou les éléments étrangers à l'organisme, sont filtrés et détruits au sein de la pulpe rouge.

Plus précisément, c'est au sein des cordons spléniques de la pulpe rouge, où le réseau de fibres de réticuline en forme de filet sert de support à de nombreux macrophages, qu'est permise la phagocytose de ces éléments. Les cellules réticulées possèdent également une faible capacité de phagocytose. Dans une rate sinusale comme celle du chien, seul le sang déversé dans la pulpe rouge par la circulation ouverte, soit 10 % du flux sanguin, traverse les cordons spléniques, le reste ne sortant pas de la circulation fermée. Cependant, le débit sanguin dirigé vers la rate est suffisamment important pour que la totalité du sang passe plusieurs fois par jour par les cordons spléniques et soit ainsi filtrée. (Valli *et al.*, 2016; Reece and Rowe, 2017)

Un premier aspect de la filtration du sang par la pulpe rouge consiste en un remodelage des globules rouges fonctionnels circulants. Elle passe par l'élimination de résidus nucléaires appelés corps de Howell-Jolly, éventuellement présents dans les globules rouges suite à l'expulsion incomplète du noyau lors de l'érythropoïèse. Ces résidus sont retirés du cytoplasme sans endommager les cellules lors de leur passage entre les cellules endothéliales des sinus veineux. (Harvey, 2012; Valli *et al.*, 2016)

Les globules rouges anormaux sont, eux, phagocytés par les macrophages spléniques. Ceux-ci comprennent notamment les sphérocytes et acanthocytes, reconnus par la perte de leur plasticité et de leur déformabilité, entraînant un défaut de leur circulation dans l'organe. Concernant les érythrocytes sénescents, différents mécanismes permettent leur reconnaissance par les cellules du système des phagocytes mononucléés. En effet, si des déterminants intrinsèques à la cellule (activité métabolique diminuée, altérations morphologiques, volume cellulaire réduit) peuvent être détectés, des altérations de surface des érythrocytes constituent aussi des marqueurs du vieillissement cellulaire. Parmi celles-ci, on compte la présence en quantité importante de glycosamines, formées au cours de la vie des érythrocytes, ou encore la fixation d'immunoglobulines autologues et d'opsonines, due à la diminution de la quantité d'acide sialique et de CD47 (Cluster de différenciation 47) en surface. Lorsque l'un de ces indicateurs révèle la sénescence de la cellule, cette dernière est éliminée par érythrophagocytose. (Valli *et al.*, 2016)

#### 4. Récupération et stockage du fer hémique

Lors de la phagocytose d'érythrocytes anormaux ou sénescents, le fer contenu dans l'hème est récupéré par les macrophages et stocké, soit sous forme de ferritine, un complexe protéine-fer, soit dans des granules d'hémosidérine après incorporation par un phagolysosome. (Valli *et al.*, 2016) Le fer stocké sous forme de ferritine peut ensuite circuler dans l'organisme lié à la transferrine, notamment vers la moelle osseuse pour participer à la synthèse de l'hémoglobine. L'hémosidérine constitue en revanche une forme de stockage irréversible du fer, qui ne peut plus être recyclé et est alors éliminé. (Rannou, 2013)

#### 5. Rôle immunitaire

La rate fait partie des organes lymphoïdes secondaires, c'est-à-dire l'ensemble des organes ayant la capacité de répondre à une stimulation antigénique en initiant une réponse immune. Ces organes sont caractérisés par la présence de cellules présentatrices d'antigènes, dont le rôle est de prendre en charge les antigènes extérieurs, et de lymphocytes, qui médient la réponse immunitaire. (Tizard, 2018) Dans la rate, la fonction immunitaire consiste en la réponse immunitaire à l'encontre d'antigènes circulant dans le sang. (Cruz Cardona *et al.*, 2020) En effet, contrairement aux autres organes lymphoïdes secondaires tels que les nœuds lymphatiques, la rate ne contient pas de vascularisation lymphatique afférente et le fluide corporel parvenant à la pulpe blanche est le sang. (Valli *et al.*, 2016)

L'initiation d'une réponse immune à l'encontre d'un antigène sanguin fait d'abord intervenir les cellules présentatrices d'antigènes concentrées dans la zone marginale. L'antigène est ainsi transporté principalement par des macrophages jusqu'aux follicules lymphoïdes de la pulpe blanche, peuplés de lymphocytes B, entraînant leur différenciation et la formation de follicules réactionnels. Ceci conduit à la colonisation de la pulpe rouge par des plasmocytes produisant des anticorps, notamment des IgM (Immunoglobulines M) et à la formation d'une population de lymphocytes B mémoires distribués aux organes lymphoïdes périphériques.

D'autres médiateurs de la réponse immunitaire sont produits, tels que des protéines opsonisantes (tuftisine, properdine), ou des substances activant la phagocytose par les neutrophiles ou la destruction par le système du complément. (Noroy, 2003; Valli *et al.*, 2016) Les lymphocytes T spléniques, résidant principalement dans les MLPA, sont également activés par les cellules présentatrices d'antigène. Ceci conduit à la différenciation de lymphocytes T CD8+, également nommés lymphocytes T cytotoxiques, migrant vers la zone marginale et la pulpe rouge pour participer à la destruction de l'agent pathogène. Plus tard, une partie de ceux-ci se différencie vers un état de lymphocyte T mémoire et rejoint à nouveau les MLPA. (Lewis *et al.*, 2019)

## D. Conclusion

La rate est un organe complexe, riche en cellules, entrant en jeu dans de nombreuses fonctions de l'organisme. Cependant, elle peut être le théâtre de divers mécanismes pathologiques, parmi lesquels la carcinogenèse est un processus fréquent. En effet, dans une étude analysant de manière rétrospective le diagnostic histologique établi sur des chiens chez lesquels une splénomégalie avait été détectée, la proportion de tumeurs spléniques approchait 44 %. (Day *et al.*, 1995) De nombreuses tumeurs primaires sont décrites dans cet organe, dont des tumeurs vasculaires, des tumeurs lymphoïdes et myéloïdes, ou encore des tumeurs mésenchymateuses plus ou moins différenciées, comme les fibrosarcomes ou les léiomyosarcomes. (Johnson *et al.*, 1989; Day *et al.*, 1995)

Le but de cette thèse était l'étude d'une méthode facilitant le diagnostic des tumeurs vasculaires spléniques. La partie suivante s'applique donc à présenter ces tumeurs vasculaires spléniques sur les plans histopathologique, diagnostique et thérapeutique, ainsi qu'à identifier les difficultés pouvant se poser lors de la démarche diagnostique de ces tumeurs.

## II. Tumeurs vasculaires chez le chien : présentation et cas particulier des tumeurs vasculaires spléniques

Les tumeurs comptent parmi les causes les plus fréquentes de splénomégalie ou de masse splénique chez le chien. Parmi elles, celles ayant pour origine les cellules endothéliales sont les plus fréquentes. (Dobson, 2011) Plusieurs études se sont attachées à estimer les fréquences relatives des différentes lésions spléniques, dont celle des tumeurs vasculaires :

- ❖ Dans une étude rétrospective menée sur 100 chiens présentant une splénomégalie isolée non liée à une maladie systémique connue telle qu'un lymphome, un mastocytome ou une maladie infectieuse ou dysimmunitaire, *Johnson et al. (1989)* ont noté que 44 d'entre eux présentaient une tumeur vasculaire splénique maligne.
- ❖ *Day et al. (1995)* de leur côté, ont comptabilisé 21 tumeurs vasculaires spléniques, dont 17 malignes, sur 87 cas de chiens atteint de splénomégalie, soit 24 % des causes de splénomégalie dans leur population.
- ❖ En 1997, *Spangler et Kass* ont diagnostiqué, sur 500 chiens ayant subi une splénectomie suite à la mise en évidence d'une anomalie splénique, 24 % d'hémangiosarcomes. Ce type tumoral représentait alors 51 % des néoplasies spléniques diagnostiquées, alors que les hémangiomes ne comptaient que pour 7 % de celles-ci.

Dans ces études, les hémangiosarcomes étaient de loin la tumeur la plus fréquemment rencontrée dans la rate lors de splénomégalie. À titre de comparaison, la deuxième tumeur la plus fréquente dans l'étude de *Spangler et Kass (1997)* correspondait aux lymphomes et ne représentait que 4 % des causes de splénomégalie. Ces études illustrent donc la proportion importante de tumeurs vasculaires diagnostiquées lors d'anomalie splénique, même si leur fréquence reste difficile à estimer précisément.

Outre leur fréquence, les tumeurs vasculaires spléniques canines tiennent également leur importance de leur pronostic défavorable, dû à un risque métastatique important et des complications possiblement mortelles telle que la rupture splénique. La gravité des dommages causés par ces tumeurs conduit à consacrer d'autant plus d'importance à leur détection et à leur prise en charge.

Cette partie s'applique donc à présenter les tumeurs vasculaires spléniques, la démarche à suivre pour les diagnostiquer et les difficultés pouvant se présenter au clinicien et au pathologiste lors de l'application de cette démarche diagnostique.

## A. Hémangiome

### 1. Définition et épidémiologie

Les tumeurs bénignes des cellules endothéliales vasculaires, appelées hémangiomes, sont des tumeurs atteignant fréquemment le chien, toutes localisations confondues. (Gamlem and Nordstoga, 2008) Dans une étude rétrospective menée au Portugal et comptabilisant les données de 9 079 tumeurs canines diagnostiquées dans cinq laboratoires d'histopathologie en 2019 et 2020, les hémangiomes représentaient près de la moitié des tumeurs vasculaires, et 2,6 % de l'ensemble des tumeurs. (Pinello *et al.*, 2022) Les sites privilégiés d'hémangiomes sont le derme et le tissu sous-cutané, mais ils peuvent advenir dans n'importe quel tissu vascularisé, dont la rate, deuxième localisation préférentielle de cette tumeur. (Gouallec, 2005; Robinson and Robinson, 2016). Selon les études, les hémangiomes compteraient pour 1 à 5 % des affections spléniques chez le chien. (Day *et al.*, 1995; Gouallec, 2005)

Les chiens atteints d'hémangiome splénique sont généralement âgés de plus de neuf ans, et aucune prédisposition de sexe n'est notée. (Day *et al.*, 1995)

Ces tumeurs présentent un comportement non invasif à distance, avec une croissance localisée au site primaire de la tumeur. (Gamlem and Nordstoga, 2008) La formation d'hématomes intra-tumoraux et la rupture splénique secondaire à une fragilisation de l'organe sont des complications possibles de la croissance de l'hémangiome. (Gouallec, 2005)

### 2. Aspect macroscopique

Macroscopiquement, les hémangiomes se présentent comme un nodule unique d'une taille pouvant varier de sept à 20 cm (Day *et al.*, 1995), de couleur rouge-noir, avec écoulement de sang à la section (Robinson and Robinson, 2016). Il peut être plurilobé et contenir des hématomes. Lors d'hémangiome splénique, les métastases sont toujours absentes, alors qu'elles sont parfois présentes lors d'HSA. (Gouallec, 2005)

### 3. Aspect microscopique

À l'histologie, un réseau complexe d'espaces remplis de sang est observable, bordé par un endothélium vasculaire unistratifié, relativement normal avec des cellules planes, uniformes et bien différenciées, associé à des zones hémorragiques parfois étendues. Entre les espaces vasculaires, du tissu conjonctif composé de collagène est présent, le plus souvent en faible quantité. (Day *et al.*, 1995; Robinson and Robinson, 2016; Meuten, 2017)

Les hémangiomes peuvent être classés en deux catégories : capillaires ou caverneux, suivant le diamètre des espaces vasculaires qui les composent. (Robinson and Robinson, 2016) Les hémangiomes capillaires sont formés d'espaces vasculaires de la taille de capillaires, tandis que les hémangiomes caverneux, qui semblent plus fréquents, montrent des structures vasculaires larges pouvant contenir des thrombi en plus de sang. Cependant, cette classification reste simplificatrice puisqu'il n'est pas rare d'observer des hémangiomes d'apparence mixte, avec des zones d'apparence capillaire et d'autres caverneuses. (Gamlem and Nordstoga, 2008)

#### 4. *Présentation clinique et exploration diagnostique*

Lors d'hémangiome splénique chez un chien, ce dernier ne présente généralement pas de signes cliniques au début de la formation tumorale. Cependant, une croissance importante de la masse peut entraîner des répercussions sur l'état général de l'animal, qui présentera alors fatigue, abattement, distension abdominale, douleur et perturbation gastro-intestinales occasionnant vomissements et constipation. Lors de rupture splénique, un hémopéritoine avec état de choc et une anémie sont observés. (Gouallec, 2005)

Généralement, un hémangiome splénique n'occasionne pas d'anomalies biochimiques et hématologiques chez l'animal. Lors de la formation d'hématomes ou de rupture splénique, une anémie régénérative peut être notée, et s'accompagner d'une thrombopénie et d'une neutrophilie. (Gouallec, 2005)

Lors de l'exploration diagnostique, des examens d'imagerie médicale permettent d'appuyer la suspicion d'hémangiome splénique, mais pas de la confirmer. Une radiographie abdominale révèle une masse splénique sphérique ou multilobée, de taille variable, s'étendant parfois jusqu'à la région pelvienne. À l'échographie de la rate, une masse pouvant déformer l'organe, une splénomégalie marquée ou une échogénicité hétérogène sont observées. (Gouallec, 2005) Dans tous les cas, la distinction entre tumeur bénigne et maligne n'est pas possible sur la base de critères échographiques. (Mattoon and Duffy, 2002) Finalement, seule l'analyse histologique de plusieurs prélèvements de la tumeur, généralement obtenus après splénectomie, permet le diagnostic définitif d'hémangiome.

#### 5. *Traitement et pronostic*

Les hémangiomes ne présentant pas de comportement invasif, l'exérèse chirurgicale en marges saines est curative. (Robinson and Robinson, 2016) Le pronostic est donc bon si la tumeur est diagnostiquée avant une éventuelle rupture splénique, qui engagerait la vie de l'animal. La médiane de survie après chirurgie peut dépasser plusieurs années et est significativement plus longue que celle associée aux hémangiosarcomes. (Dahl *et al.*, 2008) Aucune étude n'a mis en évidence de possibilité d'évolution d'un hémangiome vers un hémangiosarcome. (Meuten, 2017)

## B. Hémangiosarcome

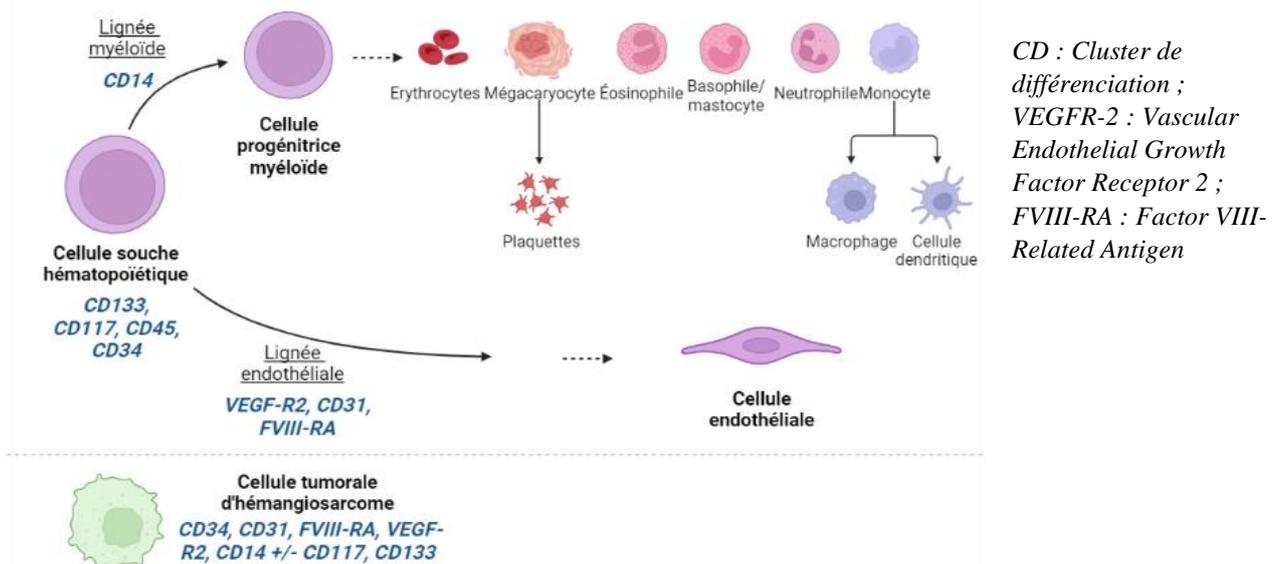
Un hémangiosarcome (HSA) se définit comme une tumeur maligne ayant pour origine l'endothélium de vaisseaux sanguins. Il s'agit d'un type tumoral plutôt fréquent chez le chien, car il représente, toutes localisations confondues, 0,3 à 2,7 % des tumeurs. (Clifford *et al.*, 2000; Pinello *et al.*, 2022) Cette néoplasie peut théoriquement apparaître dans tous les tissus vascularisés mais certaines localisations sont plus fréquentes : la rate et l'atrium droit du cœur, et dans une moindre mesure le foie et le tissu sous-cutané. (Clifford *et al.*, 2000; Smith, 2003; Soyer and Doliger, 2011; Robinson and Robinson, 2016) Le taux de métastases au moment de l'apparition des signes cliniques étant de plus de 80 %, un animal atteint d'HSA présente le plus souvent plusieurs organes affectés au moment du diagnostic. Cependant, l'atteinte d'un seul organe est possible. (Oksanen, 1978; Smith, 2003)

### 1. Définition

#### a. Cellules d'origine

Il apparaît que la population cellulaire à l'origine des cellules néoplasiques n'est pas une population de cellules endothéliales déjà différenciées, mais plutôt une population de cellules progénitrices de l'endothélium, dérivant de cellules souches hématopoïétiques à potentiel hémangioblastique, c'est-à-dire capables de former des cellules endothéliales au terme de leur différenciation. (Lamerato-Kozicki *et al.*, 2006; Gorden *et al.*, 2014; Meuten, 2017; Kakiuchi-Kiyota *et al.*, 2020) En effet, comme illustré sur la figure 12, ces cellules sont associées à l'expression à la fois de marqueurs de cellules souches hématopoïétiques, principalement CD34 et moins fortement CD117 (KIT), et de cellules endothéliales, notamment CD31 et dans une moindre mesure VEGFR-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) et le Factor VIII-Related Antigen. (Kakiuchi-Kiyota *et al.*, 2020)

Cette observation indique le caractère souche des cellules tumorales, mais aussi une capacité de différenciation suivant la lignée endothéliale voire suivant d'autres lignées, comme le montrent l'expression du gène codant CD14 par les cellules tumorales, ainsi que l'expression d'une signature génétique associée à l'inflammation et à la lignée myéloïde. (Gorden *et al.*, 2014; Kakiuchi-Kiyota *et al.*, 2020) Les cellules progénitrices proviennent de la moelle osseuse, mais on ne sait pas si elles deviennent tumorales avant leur migration vers les organes affectés ou si la tumorigenèse intervient sur des cellules progénitrices résidant dans les organes atteints. (Lamerato-Kozicki *et al.*, 2006)



**Figure 12 : Marqueurs cellulaires recherchés par Kakiuchi-Kiyota *et al.* (2020) dans des hémangiosarcomes canins.** Dans la partie haute du schéma, les marqueurs utilisés dans l'étude sont indiqués en italique sous les types cellulaires desquels ils sont caractéristiques. Dans la partie basse, les marqueurs retrouvés surexprimés dans les HSAs canins par rapport à des tissus sains sont notés. (Source : C. Klein. Créé avec biorender.com)

Ainsi, la genèse des hémangiosarcomes peut être résumée par la transformation tumorale de cellules progénitrices endothéliales multipotentes, conservant une capacité de différenciation, à l'origine d'une diversité de présentations et d'expressions génétiques. (Gorden *et al.*, 2014; Kakiuchi-Kiyota *et al.*, 2020)

### b. Éléments pathogéniques

Les processus génétiques et moléculaires participant à la genèse des hémangiosarcomes canins ont également été investigués.

D'une part, l'expression génétique des HSAs canins est variable. Gorden *et al.*, (2014) définissent trois sous-types d'HSAs selon leurs profils d'expression : un associé à la fonction d'angiogenèse et à la différenciation en cellules endothéliales, un autre à celle de l'inflammation et à la lignée myéloïde, et un troisième à l'adipogenèse. Ces groupes ne sont pas reliés à la race, à la localisation de la tumeur ou encore à sa classification histologique. Ils semblent donc être définis de manière indépendante des autres caractéristiques distinguant ces tumeurs, identifiables par ces signatures génétiques et liés à la pluripotence des cellules d'origine.

De nombreuses anomalies génétiques ont été détectées dans les HSAs canins. Entre autres, des mutations ponctuelles sur les gènes *TP53*, *PIK3CA*, *PTEN*, *PIK3R1*, *AKT1* sont fréquemment retrouvées lors de séquençage de tissu tumoral. (Wang *et al.*, 2017, 2020; Megquier *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2021; Wong *et al.*, 2021, 2022) Des altérations du nombre de copies de certains gènes ont également été associées aux HSAs canins, avec un gain d'expression pour les gènes *PDGFRA*, *VEGFA*, *KIT*, *KDR*, et une diminution pour *CDKN2A/B* et *PTEN*. (Wang *et al.*, 2017; Megquier *et al.*, 2019) La plupart de ces gènes sont des oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs connus dans l'espèce humaine, c'est-à-dire des gènes dont la mutation ou la modification d'expression induisent, dans le premier cas, une suractivation, et dans le deuxième, une inactivation, qui conduira à des mécanismes oncogéniques. D'autres de ces gènes ont été identifiés comme entrant en jeu dans la pathogénie des angiosarcomes humains, une tumeur ressemblant fortement à l'hémangiosarcome canin. Parfois, notamment dans le sous-type angiogénique, des fusions de deux gènes sont mises en évidence. Elles peuvent impliquer les gènes suivants : *MYO16:PTK2*, *GABRA3:FLT1* et *AKT3:XPNPEP1*. (Kim *et al.*, 2021) Toutes ces altérations génétiques ne sont pas présentes de façon concomitante, le profil génétique est variable selon les cas. Par exemple, il semble que la fréquence d'apparition de certaines mutations dépende de la localisation viscérale ou cutanée de la tumeur. (Wong *et al.*, 2021) En outre, une forte hétérogénéité génétique, de cause inconnue, est retrouvée entre les tumeurs issues de patients différents, et même au sein de régions distinctes d'une même tumeur. (Wong *et al.*, 2022)

Il a également été montré que les HSAs canins surexprimaient certains récepteurs tyrosine kinase (RTKs) par rapport aux cellules endothéliales normales, qui pourraient alors constituer des cibles thérapeutiques. C'est le cas de VEGFR-2 et VEGFR-3, des récepteurs dont l'activité est impliquée dans la vascularisation, et PDGFR-2 (Platelet-derived growth factor receptor-2), souvent identifiés dans les HSAs alors qu'ils sont absents de l'endothélium vasculaire sain. C'est également le cas de KIT, un récepteur codé par le proto-oncogène *c-kit* et dont l'activité promeut le développement et le maintien de certaines cellules comme les cellules souches hématopoïétiques et les mastocytes. Ce dernier a été détecté par IHC dans des hémangiosarcomes humains et canins, à des fréquences variables pouvant aller de 30 à 76 % chez le chien, alors qu'il n'était pas ou peu retrouvé dans les hémangiomes. Pour les deux espèces, l'hypothèse la plus probable est que cette surexpression de KIT soit liée à l'immaturité des cellules d'origine de la tumeur plutôt qu'à une mutation génétique. (Sabattini and Bettini, 2009; Adachi *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016)

En outre, deux voies de signalisation cellulaires ont été observées suractivées dans des HSAs canins. Il s'agit des voies MAPK/ERK (Mitogen activated protein kinase/Extracellular signal-regulated kinase), et PI3K/AKT/mTOR (phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/mammalian target of the rapamycin). (Murai *et al.*, 2012; Adachi *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020) La première est connue pour son implication dans la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie des cellules et l'apoptose (Kim and Choi, 2010), tandis que la seconde joue notamment un rôle dans la régulation du cycle cellulaire (Wong *et al.*, 2021). La dérégulation de ces voies de signalisation est également associée aux angiosarcomes dans l'espèce humaine, et ces deux voies constituent des cibles thérapeutiques éventuelles. (Andersen *et al.*, 2013; Adachi *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020)

Enfin, le microenvironnement tumoral constitue aussi un facteur influençant la croissance des HSAs canins. Il a été montré que les chiens atteints d'hémangiosarcome ont des concentrations plasmatiques de VEGF (Vascular endothelial growth factor), et sériques de big endothéline-1, augmentées par rapport à des chiens sains, indiquant qu'une dérégulation de l'endothélium entre potentiellement en jeu dans ces tumeurs. (Clifford *et al.*, 2001; Fukumoto *et al.*, 2015; Griffin *et al.*, 2021) D'autre part, le microenvironnement tumoral des HSAs est inflammatoire (Tamburini *et al.*, 2010), et les cellules tumorales expriment à la fois des médiateurs inflammatoires comme l'interleukine 8 (IL-8) et des récepteurs sur lesquels peuvent agir des chémokines telles que le Chemokine (CXC motif) Ligand-12 (CXCL12). La présence de ces molécules pro-inflammatoires dans le microenvironnement tumoral a été associée à la survie et la migration des cellules tumorales. (Kim *et al.*, 2015) Une étude a récemment montré que les gènes surexprimés dans les HSAs canins étaient majoritairement associés au remodelage de la matrice extracellulaire, suggérant que celle-ci joue un rôle important dans la pathologie de ces tumeurs, probablement par l'intermédiaire de molécules exprimées par les cellules tumorales elles-mêmes. Ceci est à mettre en lien avec l'apparence histologique des hémangiosarcomes, dans laquelle la matrice extracellulaire est parfois fortement modifiée, notamment par la présence d'un réseau de fibres collagéniques bordées par des cellules tumorales. (Mukai *et al.*, 2020)

Finalement, la pathogénie des HSAs canins, non entièrement élucidée, fait intervenir de multiples éléments moléculaires. Cela pourrait être un élément explicatif de la diversité de ces tumeurs. Malgré cette diversité, des points communs sont retrouvés dans les caractéristiques génétiques et biologiques des hémangiosarcomes canins et des angiosarcomes humains.

### c. Croissance tumorale et dissémination

De façon générale, les HSAs sont des tumeurs très agressives, présentant un potentiel invasif localement et un potentiel métastatique rapide par voie sanguine. Les organes de prédilection des métastases d'hémangiosarcomes (toutes origines confondues) sont le foie, les poumons, le système nerveux central, la peau ou encore les os. Plus rarement, des métastases peuvent se développer à partir d'embolies lymphatiques, atteignant alors les nœuds lymphatiques loco-régionaux. (Oksanen, 1978; Smith, 2003; Soyer and Doliger, 2011; Robinson and Robinson, 2016)

Concernant les hémangiosarcomes spléniques en particulier, les métastases sont la plupart du temps (dans environ trois quarts des cas) confinées à la cavité abdominale, atteignant notamment le foie, le péritoine et le mésentère, voire d'autres organes abdominaux. (Waters *et al.*, 1988; Wendelburg *et al.*, 2015) Les métastases extra-abdominales, bien que peu communes, sont possibles dans les poumons, le myocarde, le diaphragme et le cerveau. (Hirsch *et al.*, 1981; Waters *et al.*, 1988) Les HSAs localisés dans la rate présentent, outre la capacité de métastaser en empruntant les systèmes circulatoires de l'organisme, une possibilité d'extension locale par des greffes, advenant lors de rupture d'une masse et dissémination de cellules tumorales dans l'abdomen. Elles forment dans ce cas des métastases en semailles dans la cavité péritonéale. (Oksanen, 1978; Hirsch *et al.*, 1981; Soyer and Doliger, 2011; Robinson and Robinson, 2016)

Lors d’HSA splénique, un HSA de l’atrium droit peut être présent de façon concomitante. (Waters *et al.*, 1988; Boston *et al.*, 2011) Il sera donc pertinent de rechercher une tumeur cardiaque lors du diagnostic d’hémangiosarcome splénique, et *vice versa*. Parfois, plusieurs hémangiosarcomes sont retrouvés chez un animal et l’identification du site primaire est alors difficile. (Oksanen, 1978; Waters *et al.*, 1988)

## 2. Épidémiologie

### a. Âge et sexe des animaux atteints

Concernant les HSAs en général, et pas uniquement ceux affectant la rate, il est constaté qu’ils touchent des animaux âgés de neuf à 12 ans (Clifford *et al.*, 2000), sans prédisposition de sexe (Hirsch *et al.*, 1981) ou avec une prévalence légèrement supérieure chez les mâles (Grüntzig *et al.*, 2016).

Si l’on croise les données épidémiologiques de plusieurs études portant plus spécifiquement sur les hémangiosarcomes spléniques, ceux-ci affecteraient des chiens âgés d’en moyenne 10 ans. (Tableau I)

Étude	Nombre de cas	Âge moyen au diagnostic (années)
Johnson <i>et al.</i> , 1989	43	10,9
Day <i>et al.</i> , 1995	17	9,55
Spangler et Kass, 1997	107	11
Wendelburg <i>et al.</i> , 2015	208	10
Prymark <i>et al.</i> , 1988 (d'après Gouallec, 2016)	217	10,3
Waters <i>et al.</i> , 1988	25	10,8
<b>Moyenne</b>		<b>10,425</b>

Ces études ne mettent pas en avant de prédisposition nette selon le sexe de l’animal. (Tableau II) En revanche, il semble que la stérilisation soit un facteur favorisant l’apparition d’HSA splénique chez la femelle, et moins clairement chez le mâle. (Meuten, 2017)

Étude	Nombre de cas	Mâles	Femelles
Johnson <i>et al.</i> , 1989	43	23 soit <b>53%</b>	20 soit <b>47%</b>
Day <i>et al.</i> , 1995	17	9 soit <b>53%</b>	8 soit <b>47%</b>
Spangler et Kass, 1997	107	<b>45%</b>	<b>55%</b>
Waters <i>et al.</i> , 1988	25	12 soit <b>48%</b>	13 soit <b>52%</b>

## b. Influence de la race

Les données épidémiologiques semblent indiquer que la race de l'animal est liée au risque d'hémangiosarcome. Notamment, le Berger Allemand et le Golden Retriever sont les races pour lesquelles un risque majoré d'HSA a été rapporté. (Dobson, 2013) Dans leurs études, *Johnson et al. (1989)* et *Day et al. (1995)* ont conjointement noté une proportion importante de Labradors et de Bergers Allemands au sein de leurs échantillons de chiens atteints de tumeurs spléniques. Cependant, un biais possible est mentionné, lié à l'importance de ces races dans les populations de chiens domestiques à l'époque où ont été écrites ces études.

Des études plus récentes confirment la prédisposition des Golden Retrievers et des Bergers Allemands aux HSAs spléniques. (Spangler and Kass, 1997; Grüntzig *et al.*, 2016; Kent *et al.*, 2018; Davies and Taylor, 2020) *Spangler et Kass (1997)* montrent également une tendance des Labrador Retrievers et des Caniches à contracter ce type tumoral. Concernant le Golden Retriever, il semble que la prédisposition aux hémangiosarcomes soit effective dans les populations canines américaines et non européennes. Ceci pourrait s'expliquer par une différence génétique relativement importante entre ces deux sous-populations qui sont peu croisées entre elles. (Dobson, 2013)

## c. Autres facteurs prédisposants : infections et inflammations chroniques

Par ailleurs, certains facteurs apparaissent fréquemment associés à la maladie, sans forcément que des liens de cause à effet soient établis.

Certains auteurs se sont intéressés aux infections intracellulaires et aux inflammations chroniques comme possibles facteurs favorisant l'oncogenèse des cellules endothéliales. C'est le cas de *Lashnits et al. (2020)*, qui ont recherché un lien entre infection intravasculaire chronique bactérienne ou à protozoaires et développement d'HSA. Ils ont trouvé une plus grande proportion d'HSAs contenant de l'ADN de bartonelles, des bactéries envahissant les cellules endothéliales (Beerlage *et al.*, 2012), que d'HSAs contenant de l'ADN de babésies ou de mycoplasmes hémotropes. De plus, les HSAs spléniques contenaient également plus souvent des bartonelles que les biopsies de rates exemptes de tumeur.

Ces observations, associées au fait que *Bartonella spp.* peut être retrouvée dans des lésions vasoprolifératives chez plusieurs espèces dont le chien, qu'elle peut induire une production de VEGF *in vitro* et une angiogenèse chez l'Homme, et qu'elle peut causer des désordres prolifératifs de l'endothélium chez l'Homme et le chien, indiquent une potentielle implication de *Bartonella spp.* dans la genèse ou la progression des HSAs canins. Cependant, il n'est pas impossible que, plutôt qu'être la cause d'une vasoprolifération, *Bartonella spp.* soit en fait attirée par les sites cibles de phénomènes néoplasiques et inflammatoires, expliquant sa détection dans ces sites. (Beerlage *et al.*, 2012; Lashnits *et al.*, 2020)

### 3. Aspect macroscopique

Macroscopiquement, un hémangiosarcome splénique peut prendre la forme d'une masse splénique unique, de masses multiples ou plus rarement d'une splénomégalie globale diffuse. La couleur des masses peut aller du gris pâle au rouge-noir avec une apparence hémorragique. Leur taille peut varier d'un à une trentaine de centimètres. La plupart du temps, l'HSA prend la forme d'une grosse masse rouge-noir cavaire, mais il peut également se présenter sous la forme de petites masses grisâtres plus solides. (Figure 13) À la section, le parenchyme est modifié, montrant des plages rouge foncé, un possible aspect en nid d'abeille et/ou des zones nécrotiques et/ou hémorragiques. Par endroits, des zones plus pâles peuvent correspondre à une plage plus riche en cellules tumorales, à de la nécrose ou à de la fibrose. Des hématomes de taille variable sont souvent présents, et occupent parfois la plus grosse portion de la masse, compliquant le choix des prélèvements tissulaires à réaliser en vue d'une analyse histologique. Il arrive qu'une masse se rompe, entraînant alors des hémorragies abdominales parfois responsables d'une mort subite. Associés aux lésions spléniques, des nodules métastatiques peuvent être présents sur le péritoine. (Oksanen, 1978; Day *et al.*, 1995; Robinson and Robinson, 2016; Valli *et al.*, 2016; Meuten, 2017)



**Figure 13 : Lésions macroscopiques d'hémangiosarcomes spléniques.** À gauche, un nodule de petite taille d'apparence solide, grisâtre, et à droite, une apparence plus classique de masse rouge foncé, kystique et remplie de sang. (Source : Valli *et al.*, 2016)

Il est impossible de distinguer avec certitude un HSA splénique d'un hémangiome ou d'un hématome sur la seule base de la morphologie de la masse. L'observation de métastases est clairement en faveur d'un hémangiosarcome, mais l'absence de métastases, en revanche, ne permet pas de conclure quant à la malignité du processus. (Meuten, 2017) Par ailleurs, des greffes en semaille de tissu splénique sain non tumoral, secondaires à une rupture ancienne de la rate, sont parfois observées dans la cavité abdominale, et leur aspect macroscopique peut alors être source de confusion avec des métastases d'HSA. (Magnol *et al.*, 1998) L'observation microscopique de biopsies ou de pièces d'exérèse de lésions douteuses sur l'omentum est donc recommandée lors de la démarche diagnostique.

#### 4. Aspect microscopique

L'observation microscopique d'un HSA est caractérisée par une importante variation d'apparence d'une tumeur à l'autre, et au sein d'une même tumeur, comme le montre la figure 14 ci-après.

L'histologie montre le plus souvent un réseau de cellules endothéliales polymorphes, fusiformes à polyédriques, de taille moyenne à grande, avec un cytoplasme modéré à abondant, parfois vacuolisé. Les cellules surlignent des espaces vasculaires irréguliers, s'apparentant à des capillaires sanguins tortueux ou à des cavités plus larges, séparés par de fins septa ou des plages plus larges de tissu conjonctif. Ces espaces vasculaires renferment des hématies et des cellules sanguines circulantes. Dans certaines zones, des amas d'hémossidérine, un pigment résultant de la dégradation de l'hémoglobine, sont visibles dans le cytoplasme de sidérophages.

Les noyaux des cellules tumorales sont de taille variable, arrondis ou fusiformes, parfois multiples, et peuvent contenir des nucléoles quelques fois volumineux. Des mitoses peuvent être observées dans le contingent néoplasique, à raison de une à trois mitoses par champ à fort grossissement. Les mitoses sont parfois anormales (asymétriques ou tripolaires par exemple). (Oksanen, 1978; Day *et al.*, 1995; Gamlem and Nordstoga, 2008; Göritz *et al.*, 2013; Kiehl and Calderwood Mays, 2016; Meuten, 2017)

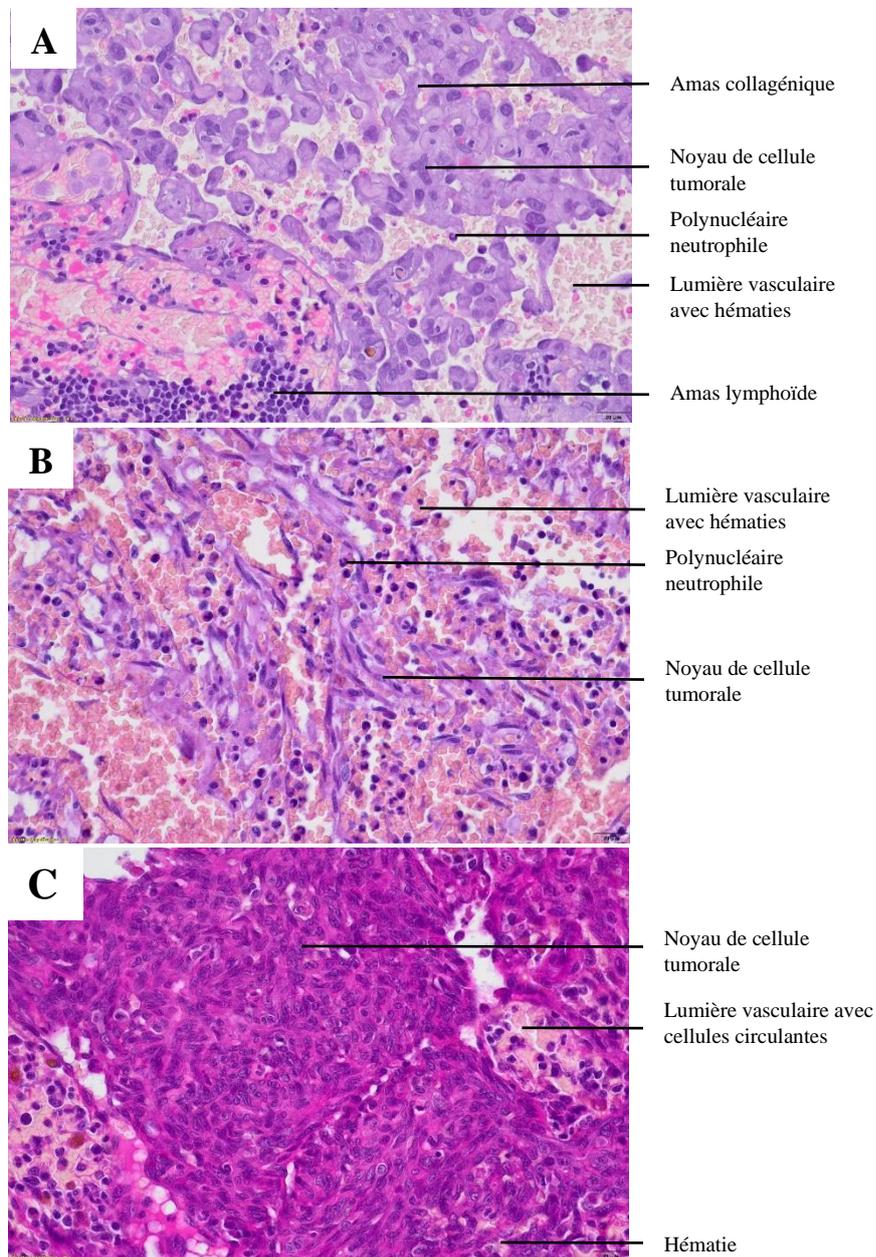
Associées aux cellules tumorales, des plages d'hémorragie, de nécrose, d'hématopoïèse extra-médullaire ou des dépôts de fibrine (thrombi) sont fréquemment visibles. (Bertazzolo *et al.*, 2005; Göritz *et al.*, 2013; Meuten, 2017) D'autre part, des cellules inflammatoires ou résidentes de l'organe s'ajoutent au contingent tumoral, complexifiant l'analyse des préparations histologiques. (Meuten, 2017)

Différentes organisations architecturales peuvent être observées pour ce type de tumeur. L'hémangiosarcome peut alors être qualifié de solide, capillaire ou encore caverneux. Les HSAs capillaires et caverneux sont définis similairement aux hémangiomes, et la forme solide correspond à une situation où les espaces vasculaires sont pratiquement inexistant tant la prolifération de cellules tumorales est importante. (Gamlem and Nordstoga, 2008; Meuten, 2017) Le plus souvent, plusieurs de ces organisations coexistent au sein d'une même tumeur et les formes présentent une certaine continuité les unes avec les autres. (Göritz *et al.*, 2013) Certains HSAs, qualifiés d'épithélioïdes, sont caractérisés par des cellules tumorales d'aspect similaire à celui de cellules épithéliales, c'est-à-dire polygonales avec un noyau rond et un cytoplasme éosinophile abondant. (Gamlem and Nordstoga, 2008; Meuten, 2017)

À ce jour, aucun système de grading basé sur les lésions microscopiques et associé à une survie différente n'a été établi pour les HSAs spléniques canins.

L'hémangiosarcome se distingue histologiquement de l'hémangiome par l'organisation plus irrégulière des espaces vasculaires, une cellularité plus importante, des cellules tumorales moins pavimenteuses, au noyau plus dodu, des anomalies cyto-nucléaires plus fréquentes et une activité mitotique plus importante. (Robinson and Robinson, 2016; Meuten, 2017)

Parfois, la morphologie observée à l'examen histopathologique est bien différente de celle décrite ci-dessus, et la dédifférenciation morphologique des cellules endothéliales est telle que la tumeur prend l'apparence d'un sarcome indifférencié, (Oksanen, 1978; Gamlem and Nordstoga, 2008; Wittenberns *et al.*, 2021) voire d'une tumeur épithéliale (Shor *et al.*, 2009; Gázquez *et al.*, 2012) compliquant alors le diagnostic histologique.



**Figure 14 : Observations microscopiques d'hémangiosarcomes spléniques canins colorés en HE.**

Les images montrent la diversité de morphologie de ces tumeurs. **A** : Des cellules tumorales à gros noyaux sont portées par des amas de fibres collagéniques et délimitent des capillaires de forme irrégulière. **B** : La tumeur est d'organisation similaire, mais avec des cellules tumorales plus fusiformes et une trame collagénique moins importante. **C** : La densité de cellules tumorales fusiformes est tellement importante que la tumeur prend un aspect solide. Seules quelques hématies sont visibles entre les cellules tumorales, en bas de l'image. Dans tous les cas, les atypies cyto-nucléaires sont fréquentes. Obj. x40 (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

## 5. Présentation clinique

Les signes cliniques associés aux hémangiosarcomes spléniques sont peu spécifiques et incluent anémie, léthargie, anorexie, faiblesse, vomissements, diarrhées, inconfort abdominal, distension abdominale ou encore arythmies cardiaques. (Day *et al.*, 1995; Soyer and Doliger, 2011; Meuten, 2017)

La présentation clinique est assez variable. Parfois, l'animal présente des épisodes de faiblesse, voire de syncopes à répétition, suivis d'un rétablissement spontané. Ceci a lieu lors d'hémorragies intra-abdominales d'intensité moyenne, auto-résolutives, avec réabsorption du sang échappé lors d'une fragilisation de la masse. (Smith, 2003; Griffin *et al.*, 2021) Ces épisodes peuvent être associés à tous les signes cliniques précédemment cités.

L'animal peut être également présenté en urgence avec des signes de choc tels qu'une tachycardie, une tachypnée, une pâleur des muqueuses, un temps de recoloration capillaire supérieur à deux secondes, et un abattement voire un coma. Cette présentation clinique, observée lors de rupture de la masse splénique et d'hémoabdomen d'apparition brutale, est communément observée. Si un HSA de l'atrium droit est concomitant, l'animal peut aussi être présenté en urgence avec des signes de tamponnade cardiaque secondaire à un hémopéricarde. (Meuten, 2017)

Outre les signes cliniques directement dus à la croissance tumorale, des manifestations peuvent être le fruit d'un syndrome paranéoplasique : la Coagulation Intravasculaire Disséminée (CIVD). Celle-ci advient lorsque les irrégularités des vaisseaux néoplasiques sont à l'origine d'un déclenchement pathologique de la cascade de coagulation. (Day *et al.*, 1995; Soyer and Doliger, 2011; Meuten, 2017) La CIVD est un état pathologique déclenché par l'activation excessive de la cascade de coagulation, de façon généralisée dans l'organisme ou localisée dans certains organes. Elle conduit à une première phase d'hypercoagulation avec formation de microthrombi et consommation progressive des facteurs de l'hémostase, ce dernier processus étant à l'origine d'une seconde phase hémorragique. Cliniquement, la première phase est généralement assez fruste. Le plus souvent, la CIVD est remarquée lors d'une décompensation due à la consommation en excès des facteurs de l'hémostase, causant des hémorragies d'intensité variable et pouvant conduire à un état de choc hypovolémique avec des manifestations hémorragiques diverses incluant des pétéchies et suffusions, une épistaxis, une hématurie, un méléna, des saignements cavitaires... En parallèle, des signes de dysfonctionnements organiques tels que des arythmies cardiaques sont parfois présents. Sans traitement adéquat, la CIVD se solde par le décès de l'animal. (Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux, 2000; Couto and Moreno, 2014; Robinson and Robinson, 2016)

Il arrive également qu'aucun signe clinique ne soit observé et que la ou les masses spléniques soient découvertes de manière fortuite à l'occasion d'une palpation abdominale ou d'une laparotomie réalisée pour une autre raison. Par ailleurs, une mort subite intervient parfois sans signes avant-coureurs, et le diagnostic est alors établi à l'occasion d'un examen post-mortem. (Day *et al.*, 1995; Smith, 2003)

## 6. Exploration diagnostique

Différents examens complémentaires peuvent être prescrits lors de suspicion d'HSA splénique, et plus largement lors de la prise en charge d'un animal ayant des signes cliniques peu spécifiques incluant une faiblesse, avec une palpation abdominale pouvant montrer des signes de douleur, d'épanchement abdominal ou encore de splénomégalie ou masse splénique.

### a. Examens complémentaires permettant la visualisation directe de la tumeur et la réalisation d'un bilan d'extension

Les examens prioritairement envisagés dans le cas d'une telle présentation clinique sont le plus souvent des examens d'imagerie médicale. Ils permettent à la fois une visualisation plus ou moins précise de la tumeur et de sa diffusion dans l'organisme, mais aussi des conséquences directes de sa croissance telles qu'un épanchement abdominal, fréquemment retrouvé lors d'HSA splénique. Plusieurs examens sont envisageables, les plus pratiqués dans notre cas étant l'échographie, la radiographie et la tomodensitométrie.

#### i. Échographie abdominale

L'échographie abdominale est l'examen d'imagerie médicale le mieux adapté lors de suspicion de tumeur splénique. Celle-ci permet d'abord la visualisation d'une ou plusieurs masses spléniques cavitaires, de taille variable et d'échogénicité hétérogène contrastant avec l'homogénéité de la rate normale. À ce stade, la nature de la masse n'est cependant pas identifiable, bien que son aspect hétérogène et sa distribution puissent amener le praticien à suspecter une tumeur. Par exemple, un hématome et un hémangiosarcome ne sont pas différenciables par échographie. (Mattoon and Duffy, 2002; Dobson, 2011)

Une cytoponction par aspiration à l'aiguille fine, réalisée sous guidage échographique, est généralement recommandée lors de la démarche diagnostique d'une tumeur, car elle permet d'obtenir de manière peu invasive des informations orientant sur le processus en cause. Cependant, lors de la mise en évidence d'une masse cavitaire dans la rate, il est préférable de ne pas la ponctionner et de directement réaliser une exérèse. En effet, la ponction est associée à un risque de dissémination de cellules tumorales dans la cavité abdominale et de rupture de la masse splénique, à l'origine d'une hémorragie intra-abdominale pouvant conduire à la mort de l'animal. (Johnson *et al.*, 1989; Smith, 2003; Kiehl and Calderwood Mays, 2016)

La recherche de masses hépatiques est recommandée lors d'une échographie abdominale, sachant que le foie est un site fréquent de métastases d'HSA splénique. Plus largement, l'observation de l'entière de la cavité abdominale à la recherche d'autres masses ou anomalies est conseillée. Une échographie permet également la mise en évidence d'un éventuel épanchement abdominal, qui après ponction et analyse cytologique du liquide révélera un hémopéritoine. (Soyer and Doliger, 2011) Celui-ci pourra être le résultat d'une hémorragie récente, le frottis montrant alors les cellules habituelles du sang périphérique, ou ancienne, caractérisée dans ce cas par des macrophages contenant de l'hemosidérine. (Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux, 2000; Mullin and Clifford, 2019)

## ii. Radiographie

Une radiographie de l'abdomen est aussi réalisable, bien que moins précise. Elle permet d'observer une splénomégalie ou des masses spléniques, et éventuellement des masses présentes dans d'autres organes de la cavité abdominale. Lors d'hémopéritoine, une perte de contraste généralisée est observée. (Day *et al.*, 1995; Smith, 2003)

Une radiographie thoracique comprenant trois vues, une de face et deux de profil, permettra la visualisation de métastases pulmonaires, si celles-ci sont suffisamment volumineuses. Un nodule isolé est visible si son diamètre est supérieur à un demi centimètre, et que les prises de vues sont réalisées dans des conditions optimales. La plupart du temps, cependant, des images montrant de multiples nodules de tailles variables, en « lâchers de ballons », sont observées en cas de métastases pulmonaires. Parfois, la radiographie montre de nombreux nodules de deux à trois millimètres de diamètre, créant une opacification de densité miliaire. (Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux, 2000) La radiographie thoracique a une sensibilité de 80 % pour le diagnostic de métastases pulmonaires, ce qui en fait un examen de choix car facilement disponible en routine. (Smith, 2003)

Si un HSA de l'atrium droit est présent concomitamment à un HSA splénique, une masse cardiaque, responsable d'une déformation de la silhouette cardiaque sur les vues de face et de profil du thorax, est observée. Parfois, un déplacement dorsal de la trachée en vue de profil, ou des signes d'épanchement péricardique et/ou pleural, sont également visibles. (Waters *et al.*, 1988; Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux, 2000)

## iii. Examen tomodensitométrie

Un examen tomodensitométrie peut être réalisé. En cancérologie, cet examen a plusieurs indications : détection d'une tumeur, de sa localisation et de son étendue, réalisation d'un bilan d'extension et suivi après mise en place d'un traitement. Dans le cas d'un HSA splénique, cet examen ne présente pas un intérêt nettement supérieur à l'échographie, celle-ci étant suffisamment sensible pour détecter la tumeur et ses métastases abdominales. Cet aspect, associé aux faibles chances de rémission après traitement, comme expliqué ci-après, n'encouragent pas à avoir recours à cet examen en routine pour les HSA spléniques. En effet, celui-ci est coûteux, peu accessible, et nécessite d'anesthésier l'animal alors que celui-ci est déjà débilité et qu'il devra subir une autre anesthésie lors de la prise en charge chirurgicale de la masse splénique. (Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux, 2000; Mullin and Clifford, 2019)

## iv. Bilan

En conclusion, les examens d'imagerie médicale permettent la réalisation du bilan d'extension de la tumeur, même-ci, la plupart du temps, ceux-ci sont conduits avant l'obtention du diagnostic du cancer par analyse histologique de la masse. (Mullin and Clifford, 2019)

Selon les résultats du bilan d'extension, trois stades cliniques, décrits dans l'encadré 1, sont définis pour les HSAs spléniques canins. La détermination du stade clinique lors du diagnostic permet de préciser le pronostic de la maladie. (Wendelburg *et al.*, 2015)

**Encadré 1 : Stades cliniques des hémangiosarcomes spléniques canins**

(D'après Wendelburg *et al.*, 2015)

**Stade I :** tumeur confinée à la rate.

**Stade II :** hémangiosarcome splénique avec rupture splénique, ou présence de métastases dans les nœuds lymphatiques loco-régionaux.

**Stade III :** présence de métastases à distance ou masse concomitante sur l'atrium droit du cœur.

b. Examens complémentaires permettant d'évaluer l'impact de la tumeur sur le reste de l'organisme

Comme indiqué précédemment, les HSAs spléniques peuvent exercer une influence sur l'homéostasie de l'organisme, en causant des désordres variables, notamment liés au système circulatoire (hémorragies, irrégularités de la couche endothéliale de la paroi vasculaire) et aux cellules sanguines (anémie, thrombopénie, CIVD). Des examens complémentaires à la recherche de ces anomalies permettent une meilleure prise en charge et une stabilisation de l'animal, en considérant les conséquences cliniques et biologiques du cancer et pas seulement la tumeur elle-même.

Les désordres affectant les cellules sanguines, outre leur mise en évidence directe par la présence de certains signes cliniques, comme des muqueuses pâles lors d'anémie, sont explorables par des examens sanguins, incluant notamment une numération et formule sanguine (NFS) ainsi qu'un frottis sanguin. La NFS est réalisée à partir de sang veineux prélevé dans un tube contenant de l'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique). Elle permet de révéler une anémie normochrome, normocytaire et régénérative. Celle-ci a deux origines principales. D'une part, elle est secondaire aux hémorragies chroniques intra-abdominales, mais elle trouve également sa cause dans la fragmentation mécanique des globules rouges lors de leur passage dans des capillaires spléniques atteints d'altérations structurales, causant une anémie hémolytique microangiopathique. (Rebar *et al.*, 1980; Hirsch *et al.*, 1981; Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux, 2000; Smith, 2003; Soyer and Doliger, 2011; Mullin and Clifford, 2019)

Une thrombopénie est aussi présente dans 30 à 60 % des cas. (Meuten, 2017) Ses causes peuvent être la destruction des plaquettes à médiation immune, leur séquestration dans la rate, ou leur consommation excessive lors d'hémorragie ou de CIVD. (Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux, 2000; Smith, 2003; Soyer and Doliger, 2011; Mullin and Clifford, 2019) Enfin, une leucocytose neutrophilique est parfois mise en évidence. (Smith, 2003; Soyer and Doliger, 2011) Elle serait a priori secondaire à la nécrose de la tumeur, ou alors une conséquence de la croissance d'une sous-population de polynucléaires induisant une suppression de l'immunité antitumorale, qualifiés de cellules suppressives myéloïdes. (Mullin and Clifford, 2019)

Un frottis sanguin réalisé chez un chien atteint d'hémangiosarcome splénique pourra montrer, dans moins de 20 % des cas, différentes anomalies portant sur les hématies telles que : des signes d'une régénération de l'anémie (anisocytose, réticulocytose) ; des signes de l'origine microangiopathique de l'anémie (schizocytes) ; des signes d'une atteinte de la fonction de filtration du sang (hématies fragmentées, nucléées, ou présentant des reliquats de noyaux formant de petites inclusions bleues, appelés corps de Howell-Jolly) ; une hypochromie, c'est-à-dire des hématies plus claires qu'à l'ordinaire avec une accentuation de la pâleur centrale, signe d'une régénération de l'anémie (les jeunes hématies étant moins riches en hémoglobine) ou d'une déficience en fer secondaire à des saignements chroniques. (Rebar *et al.*, 1980; Hirsch *et al.*, 1981; Johnson *et al.*, 1989; Thrall, 2012; Mullin and Clifford, 2019) D'autres cellules anormales peuvent être observées, notamment des acanthocytes (Rebar *et al.*, 1980; Hirsch *et al.*, 1981; Thrall, 2012) et des sphérocytes (Johnson *et al.*, 1989).

Une NFS associée à la lecture d'un frottis sanguin constituent donc des examens pertinents à l'initiation de la prise en charge de l'animal afin de stabiliser son état général, mais également dans le but d'obtenir une première orientation diagnostique à la lumière des signes cliniques et du contexte épidémiologique.

Enfin, lors de l'exploration d'une possible CIVD associée à la tumeur, d'autres examens sont conseillés, comme le dosage des produits de dégradation de la fibrine (PDF), qui sera de valeur augmentée, et le dosage de l'antithrombine III (AT III), dont la valeur sera diminuée. Une biochimie sanguine peut montrer diverses anomalies, comme une hyperbilirubinémie due à l'hémolyse et/ou à une thrombose hépatique, une azotémie lors de microthrombose rénale importante, une panhypoprotéïnémie lors d'hémorragie sévère. Une analyse d'urine montre parfois une hémoglobinurie ou une bilirubinurie. (Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux, 2000; Moore and Frimberger, 2010; Couto and Moreno, 2014)

### c. L'histologie : gold standard pour le diagnostic morphologique

Finalement, les signes cliniques et les examens complémentaires cités précédemment fournissent des indications sur la présence de la tumeur et ses répercussions, mais leur faible spécificité ne permet pas un diagnostic précis. Seul un examen histopathologique du tissu permet le diagnostic morphologique du type tumoral, et ainsi le choix d'un traitement adapté et la communication d'un pronostic au propriétaire. L'histologie est donc le gold standard pour le diagnostic des tumeurs chez le chien. (Smith, 2003; Mullin and Clifford, 2019)

Lors de tumeur splénique richement vascularisée, il est préférable de réaliser directement son exérèse par splénectomie totale, que de tenter d'obtenir du matériel tumoral par biopsie. En effet, cette procédure entraîne un risque élevé d'hémorragie intra-abdominale. (Smith, 2003; Soyer and Doliger, 2011) Parfois, le caractère urgent de la situation impose même une splénectomie d'urgence. (Kiehl and Calderwood Mays, 2016)

L'exérèse tumorale permet ainsi de récupérer du matériel à analyser, dont la sélection doit répondre à certaines règles afin d'optimiser les chances d'obtention de portions représentatives du phénomène pathologique :

- ❖ La coloration à réaliser en premier lieu est l'Hémalun-Éosine, permettant l'observation, lors de tumeur vasculaire splénique, d'un parenchyme modifié par des cellules tumorales dont l'architecture correspond à celle décrite précédemment. (Jennings *et al.*, 2017)
- ❖ Les masses spléniques d'origine vasculaire sont souvent de grande taille, ce qui oblige à sélectionner seulement certaines portions de la lésion. L'analyse d'un unique prélèvement de la masse est insuffisante, plusieurs sections issues de zones distinctes du prélèvement doivent être observées. En effet, du fait de l'hétérogénéité des tumeurs spléniques, qui contiennent des hémorragies et de la nécrose intra-tumorale, ainsi qu'un tissu tumoral d'apparence variable selon les zones, certaines sections peuvent s'avérer non informatives. La multiplication des zones observées permet ainsi d'augmenter la sensibilité et la spécificité de l'analyse. (Johnson *et al.*, 1989; Smith, 2003; Soyer and Doliger, 2011; Robinson and Robinson, 2016; Griffin *et al.*, 2021) En pratique, le centre d'une masse de grande taille, souvent nécrotique ou hémorragique, doit être évité. En revanche, la zone incluant le cortex tumoral et le tissu périphérique d'apparence saine est souvent informative. (Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux, 2000)
- ❖ Lors de nodules ou masses multiples, même au sein d'un même organe, chaque lésion doit faire l'objet d'une analyse histologique pour être identifiée précisément. (Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux, 2000)

## 7. Traitements et données pronostiques

Sans traitement, à cause de la précocité et de la facilité à métastaser des HSAs viscéraux, leur pronostic à long terme passe de réservé lorsque la tumeur est intacte, à sombre lors de rupture de la masse. (Kiehl and Calderwood Mays, 2016) Le traitement des HSAs spléniques peut être curatif si la totalité des masses spléniques est retirée avant l'apparition de métastases, mais il est le plus souvent palliatif, le diagnostic étant trop tardif pour agir avant l'extension de la tumeur. Il inclut plusieurs options thérapeutiques.

### a. Splénectomie

Le premier volet du traitement est la chirurgie, dont l'exérèse totale de la rate est la plus couramment pratiquée. Elle permet le retrait de la totalité des masses spléniques et de la suppression du risque d'hémorragie par rupture de la masse. Dans le cas d'un chien admis pour choc et hémobdomen secondaires à la rupture d'une masse splénique, la splénectomie permet l'arrêt de l'hémorragie et, dans le meilleur des cas, le rétablissement de l'état général de l'animal. Cependant, cette solution thérapeutique seule est souvent insuffisante et associée à une médiane de survie courte. Lors d'HSA splénique pris en charge par splénectomie seule, sans chimiothérapie adjuvante, la survie médiane varie entre un et trois mois. (Smith, 2003; Wendelburg *et al.*, 2015) (Tableau III)

<b>Tableau III : Médianes de survie des chiens atteints d'HSA splénique traités par splénectomie seule</b>		
<b>Étude</b>	<b>Nombre de cas</b>	<b>Médiane de survie</b>
Prymark <i>et al.</i> , 1985 (d'après Smith, 2003)	59	19 jours
Brown <i>et al.</i> , 1985 (d'après Smith, 2003)	21	65 jours
Wendelburg <i>et al.</i> , 2015	154	48 jours

Après six mois, environ 10 % des chiens splénectomisés sont encore en vie (Soyer and Doliger, 2011) et après 12 mois, 7 % (Spangler and Kass, 1997). Des données plus récentes indiquent un taux de survie de 11,1 % à un an post-splénectomie et de 4,2 % à deux ans (Wendelburg *et al.*, 2015), mais celles-ci restent peu optimistes sur la survie des chiens traités par splénectomie seule.

#### b. Chimiothérapie adjuvante à la splénectomie

Une chimiothérapie adjuvante à la splénectomie est recommandée. Selon les études et les protocoles, les médianes de survie avec splénectomie et chimiothérapie peuvent en effet atteindre 90 à 180 jours, soit trois à six mois (Smith, 2003; Soyer and Doliger, 2011; Göritz *et al.*, 2013), avec une différence significative comparée à la médiane de survie lors de splénectomie seule (Göritz *et al.*, 2013). (Tableau IV) Après six mois, une dissémination métastatique progressive et résistante à la chimiothérapie est souvent à l'origine de la fin de vie de l'animal. (Sorenmo *et al.*, 2004) Seule l'étude de Wendelburg *et al.* (2015) ne montre pas de différence significative de la médiane de survie des chiens traités avec splénectomie et chimiothérapie conventionnelle par rapport à celle de chiens ayant uniquement subi une splénectomie, et indique une augmentation de la médiane de survie seulement en période post-opératoire directe, sans influence sur les durées globales.

<b>Tableau IV : Médianes de survie des chiens atteints d'HSA splénique traités par splénectomie et chimiothérapie adjuvante</b>			
<b>Étude</b>	<b>Type de chimiothérapie</b>	<b>Nombre de cas</b>	<b>Médiane de survie</b>
Hammer <i>et al.</i> , 1991	VAC	6	145 jours
Sorenmo <i>et al.</i> , 1993	AC	6	180 jours
Vail <i>et al.</i> , 1995	AC	16	141 jours
Wendelburg <i>et al.</i> , 2015	Variable (Dox, VAC, ou autres)	28	Env. 90 jours
Matsuyama <i>et al.</i> , 2017	Doxorubicine	18	98 jours
Faulhaber <i>et al.</i> , 2021	Doxorubicine	22	139 jours
Faulhaber <i>et al.</i> , 2021	Carboplatine	18	160 jours
Masyr <i>et al.</i> , 2021	Variable (Dox, VAC, ou autres)	70	173,5 jours

Légende : Env. : Environ ; VAC : Vincristine, Adriamycine (= Doxorubicine), Cyclophosphamide ; AC : Adriamycine (= Doxorubicine), Cyclophosphamide ; Dox : Doxorubicine.

Actuellement, la molécule préférentiellement utilisée sur les HSAs est la doxorubicine, selon le protocole de base présenté dans l'encadré 2, avec des variations possibles. L'utilisation de doxorubicine est associée à une augmentation de la durée moyenne de survie, allant alors de 141 à 179 jours, soit 4,5 à six mois. (Davies and Taylor, 2020; Faulhaber *et al.*, 2021)

### **Encadré 2 : Protocole de traitement d'hémangiosarcomes spléniques canins à la doxorubicine**

Administrer **30 mg/m<sup>2</sup>** de doxorubicine par **voie intraveineuse** sur **15 minutes**.

Commencer le traitement **10 à 15 jours après l'exérèse tumorale**, puis réitérer le traitement **toutes les trois semaines** jusqu'à atteindre **cinq administrations au total**, ou jusqu'à ce que la croissance tumorale ne soit plus maîtrisée. (Clifford *et al.*, 2000 ; Ogilvie *et al.*, 1996)

Ne pas dépasser la **dose maximale cumulée de 180 à 240 mg/m<sup>2</sup>**. (Soyer and Doliger, 2011)

D'autres molécules de chimiothérapie sont rapportées efficaces, et utilisées seules ou en association avec la doxorubicine. Le carboplatine se montre aussi efficace que la doxorubicine selon *Faulhaber et al. (2021)*, avec une médiane de survie non significativement différente de la médiane de survie avec doxorubicine de l'étude. Cependant, le faible échantillon de 18 chiens doit inciter à la prudence vis-à-vis de ces résultats. Deux études ont évalué la médiane de survie lors d'addition de cyclophosphamide à la doxorubicine, et ont obtenu des valeurs semblables au traitement avec de la doxorubicine seule. Ce traitement conduisait à des effets secondaires fréquents, d'intensité faible à modérée la plupart du temps (diarrhée, perte d'appétit, fatigue). (Sorenmo *et al.*, 1993; Vail *et al.*, 1995) Lors de traitement des HSA splénique avec un protocole VAC (vincristine, doxorubicine et cyclophosphamide), la médiane de survie atteint 145 jours. (Hammer *et al.*, 1991)

Finalement, les études menées sur les différents protocoles de chimiothérapie utilisant ou non la doxorubicine ne semblent pas montrer d'efficacité significativement différentes sur les hémangiosarcomes spléniques. (Clifford *et al.*, 2000) Cependant, elles montrent qu'il est possible d'ajuster la chimiothérapie lorsque l'animal présente des contre-indications vis-à-vis de la doxorubicine, notamment dans le cas de chiens dont une échocardiographie préliminaire montre un risque augmenté d'insuffisance cardiaque, étant donnée la toxicité cardiaque spécifique de cette molécule. (Soyer and Doliger, 2011)

En plus du traitement de la tumeur en elle-même, il est important d'apporter un soin global au patient. Ceci implique la prise en charge des signes cliniques secondaires à la tumeur, des affections concomitantes, des effets secondaires de la chimiothérapie, de la douleur, et une nutrition appropriée de l'animal. Enfin, l'euthanasie reste également une issue à considérer et à présenter au propriétaire, s'agissant d'une maladie grave, avec des répercussions cliniques parfois importantes et associée à un pronostic sombre.

### c. Autres pistes thérapeutiques

D'autres pistes thérapeutiques sont actuellement étudiées. Une liste d'essais cliniques ayant amené des résultats plus ou moins prometteurs est dressée dans cette partie.

#### i. Chimiothérapie métronomique

La chimiothérapie métronomique est une thérapie alternative à la chimiothérapie à dose maximale tolérée. Elle consiste à administrer des doses basses d'agents de chimiothérapie quotidiennement par cycles. Sa cible principale est la vascularisation de la tumeur, notamment les cellules précurseurs de l'endothélium, permettant ainsi de limiter l'angiogenèse. Elle module également la distribution des lymphocytes T circulants vers une combinaison favorable à l'activation de l'immunité. (Lana *et al.*, 2007; Wendelburg *et al.*, 2015; Matsuyama *et al.*, 2017; Chaikin and Welihozkiy, 2018)

Cette piste thérapeutique a été mise à l'essai sur des HSAs spléniques canins, seule ou en association avec une chimiothérapie conventionnelle, avec une efficacité controversée. Une étude montre des résultats encourageants en utilisant une chimiothérapie métronomique avec de l'étoposide, du cylophosphamide et du piroxicam, un anti-inflammatoire non stéroïdien. (Lana *et al.*, 2007) D'autres études ne concluent pas à une meilleure efficacité de cette thérapie, qu'elle soit donnée seule (Matsuyama *et al.*, 2017; Alexander *et al.*, 2019; Treggiari *et al.*, 2020) ou en association avec une chimiothérapie conventionnelle (Wendelburg *et al.*, 2015; Treggiari *et al.*, 2020). Le bénéfice de la chimiothérapie métronomique par rapport à la chimiothérapie à dose maximale tolérée est donc incertain. Il semble qu'elle ait une efficacité au moins équivalente, permettant d'élargir le choix de traitement à proposer aux propriétaires.

#### ii. Thérapies ciblées

L'idée de recourir à des thérapies ciblées provient de l'observation que les HSAs peuvent exprimer certaines des cibles moléculaires visées par cette classe thérapeutique, comme les RTKs VEGFR-2 et PDGFR-2 ou encore KIT. Ces résultats ont amené à supposer que ces récepteurs et leurs voies de signalisation pourraient faire l'objet de thérapies ciblées moléculaires. (Adachi *et al.*, 2016)

Certaines molécules ont donc été mises à l'essai. Le phosphate de tocéranib, par exemple, est un inhibiteur des voies de signalisation des récepteurs KIT, PDGFR et VEGFR, utilisé sur les mastocytomes canins. Cependant, il n'induit pas d'augmentation significative de la médiane de survie sur les HSA spléniques canins. (Gardner *et al.*, 2015) Une autre molécule nommée eBAT (Epidermal growth factor Bispecific Angiotoxin) montre en revanche des résultats plus prometteurs. Cette molécule, ciblant les récepteurs EGFR (Epidermal growth factor receptor) et uPAR (Urokinase plasminogen activator receptor), présents dans des sarcomes humains, a montré une efficacité lors de son utilisation chez des chiens présentant un HSA splénique de stade I ou II, après splénectomie et avant initiation de la chimiothérapie. Les chiens traités avaient une médiane de survie plus longue que le groupe témoin traité par chirurgie et chimiothérapie. (Borgatti *et al.*, 2017)

Par conséquent, l'utilisation de thérapies ciblées pourrait améliorer la prise en charge de chiens atteints d'hémangiosarcome, mais un meilleur ciblage des molécules efficaces ainsi que des patients pouvant répondre à cette thérapie est nécessaire. Des investigations pré-cliniques encourageantes (Maeda *et al.*, 2022) indiquent que ce champ pourrait être exploité dans les prochaines années.

### iii. Immunothérapie

Autre type de thérapie disponible à l'heure actuelle, l'immunothérapie a également été testée sur les HSAs canins. Celle-ci englobe l'ensemble des traitements anticancéreux agissant par activation de cellules immunitaires et stimulation de la réponse immune antitumorale.

Une première molécule, le Muramyl tripeptide-phosphatidylethanolamine (MTP-PE), ayant la capacité d'activer les capacités tumoricides des macrophages, a été décrite pour le traitement des hémangiosarcomes spléniques canins sous une forme encapsulée dans des liposomes. Ce traitement, associé à une chimiothérapie classique à base de doxorubicine ou à un protocole VAC, était associé à une médiane de survie et à une médiane de vie sans progression de la maladie significativement supérieures à celles mesurées lors de chimiothérapie seule. (Vail *et al.*, 1995) Malgré ces observations, ce médicament n'est à ce jour pas disponible sur le marché vétérinaire en Europe.

L'efficacité d'autres molécules sur des hémangiosarcomes a été évaluée sur des petits effectifs avec des résultats variables. Un vaccin destiné à initier une immunité contre les cellules endothéliales tumorales semble accroître la médiane de survie chez des chiens avec des HSAs de stade II (U'Ren *et al.*, 2007), et un autre vaccin autologue semble avoir une efficacité similaire à la chimiothérapie dans des cas d'HSAs métastatiques (Lucroy *et al.*, 2020).

D'autres traitements n'ont en revanche pas montré de bénéfices probants, comme la vaccination à base de cellules dendritiques associée à une chimiothérapie à faible dose (Konduri *et al.*, 2019) ou l'Immunodigin<sup>MC</sup>, un médicament biologique extrait de fractions de parois mycobactériennes, combinée à la doxorubicine (Musser *et al.*, 2022).

### d. Facteurs influençant le pronostic

Il semble que la médiane de survie post-splénectomie et la réponse au traitement des chiens atteints d'HSA soient influencées par certains éléments.

Le premier facteur mentionné est le stade clinique de la maladie au moment du diagnostic. En effet, il apparaît que les chiens atteints d'HSA splénique de stade initial III, donc métastatique, aient une médiane de survie significativement plus courte que les chiens en stade I ou II. (Görütz *et al.*, 2013) Cette différence est observée pour des chiens traités par une splénectomie seule (Wendelburg *et al.*, 2015) et pour des chiens traités par splénectomie et chimiothérapie (Masyr *et al.*, 2021). La cohérence des résultats de ces trois études amène à penser qu'une corrélation négative entre le stade et la médiane de survie est probable.

Outre son effet sur la survie des patients, le stade clinique semble également influencer la réponse de la maladie au traitement. Dans l'étude de *Masyr et al. (2021)*, la valeur de Progression-Free Interval (PFI), c'est-à-dire la durée passée sans apparente évolution du cancer à compter de la splénectomie, est significativement plus faible chez des chiens atteints d'HSA de stade III que de stade I et II. Cette valeur est indicatrice d'un pronostic moindre et d'une qualité de vie probablement plus rapidement dégradée chez les chiens en stade III.

Un autre élément à prendre en compte pour définir le pronostic d'un HSA est le succès de la chirurgie. Si l'exérèse tumorale est incomplète, la médiane de survie après chirurgie est significativement plus courte que lors d'exérèse en marges saines. (*Ogilvie et al., 1996*) Cet aspect n'a que peu d'importance lorsque l'on considère les tumeurs spléniques, car l'ablation chirurgicale de l'organe entier permet d'assurer l'exérèse en marges saines. Cependant, il est à garder en mémoire lors de l'exérèse chirurgicale de métastases dans d'autres organes.

Enfin, d'autres facteurs d'influence potentiels ont été étudiés, sans mise en évidence de leur influence sur la durée de survie post-splénectomie. C'est le cas de l'âge, du poids et du statut reproductif de l'animal, de la présence d'un hémobdomen, de la réalisation d'une transfusion, ainsi que de la taille de la masse et du ratio volume de la masse sur volume corporel. (*Wendelburg et al., 2015; Masyr et al., 2021*) Le mode de croissance (capillaire, caverneux, solide) de la tumeur ne semble pas non plus avoir de répercussion sur la médiane de survie. (*Göritz et al., 2013*)

### 8. Cas particulier : l'hémangioendothéliome

Une autre forme tumorale, proche de l'HSA mais de malignité inférieure, a été décrite : l'hémangioendothéliome. Dans leur étude, *Gamlem et Nordstoga (2008)* la classent dans une catégorie à part des hémangiomes et des HSAs, appelée « tumeurs de malignité intermédiaire ». Les auteurs décrivent les hémangioendothéliomes comme des tumeurs à croissance non-lobulaire, contrairement à la plupart des hémangiomes, et présentant une cellularité et une activité mitotique intermédiaires entre les hémangiomes et les HSAs (une à sept mitoses pour 10 champs à fort grossissement la plupart du temps). Ils définissent deux sous-types histologiques : les hémangioendothéliomes épithélioïdes, montrant des cellules aux allures de cellules épithéliales croissant en périphérie de la paroi vasculaire, et les hémangioendothéliomes à cellules fusiformes, composés d'espaces vasculaires irréguliers bordés de cellules fusiformes. Cette tumeur serait fréquente dans la rate du chien, ayant été diagnostiquée dans 45,7 % des cas de tumeur vasculaire splénique chez des chiens dans une étude de *Dahl et al. (2008)*. Elle serait associée à un pronostic moins sombre, avec une médiane de survie significativement plus longue que lors d'HSA splénique, et plus de 50 % de chiens encore en vie un an après exérèse chirurgicale sans chimiothérapie adjuvante.

Ce type tumoral n'a pas été considéré dans les travaux de cette thèse, et les tumeurs présentant des caractéristiques décrites dans l'article de *Gamlem et Nordstoga (2008)* ont été classées comme hémangiosarcomes.

## C. Conclusion

Les hémangiomes et hémangiosarcomes spléniques sont des tumeurs fréquentes chez le chien, bien décrites et associées à des directives précisément définies concernant leur prise en charge. Outre la recherche de traitements plus efficaces, le développement d'outils accroissant la fiabilité du diagnostic constitue un levier d'action répondant à l'objectif d'amélioration de la prise en charge des chiens atteints d'hémangiosarcome.

### III. L'immunohistochimie comme outil diagnostique des hémangiosarcomes spléniques canins ; introduction du marqueur ERG

NB : Dans toutes les photos de tissu avec immunohistochimie incluses dans cette partie, la révélation du marquage a été réalisée par le système du complexe avidine-biotine-peroxydase (ABC), sauf lors de spécifications contraires dans la légende. Cette technique donne lieu à une coloration brune du prélèvement là où est présent l'antigène.

#### A. Difficultés associées au diagnostic des tumeurs vasculaires spléniques

Les cancers présentent des caractéristiques très variables en fonction de la population cellulaire qui en est à l'origine. Cette population détermine en grande partie le mode de croissance et de dissémination de la tumeur, ainsi que les armes thérapeutiques auxquelles elle est sensible. Ainsi, mener à bien une démarche diagnostique en cancérologie est une étape primordiale pour pouvoir prendre en charge l'animal avec des options thérapeutiques adaptées à la tumeur, en considérant d'autres facteurs tels que l'état général de l'animal et les attentes des propriétaires. Si l'observation microscopique d'une tumeur splénique permet généralement son diagnostic morphologique, elle n'est pas toujours aisée et plusieurs difficultés existent.

##### 1. Diagnostic différentiel des phénomènes pathologiques d'origine vasculaire

Il peut s'avérer compliqué de distinguer un processus vasculaire non tumoral, comme un hématome, d'une tumeur vasculaire bénigne ou maligne.

Si l'examen histologique permet le plus souvent de distinguer facilement un hématome d'une tumeur vasculaire maligne, la présentation clinique et le contexte épidémiologique de ces deux entités sont très proches. Par exemple, les signes cliniques comprennent dans les deux cas des épisodes aigus de pâleur des muqueuses et de perte de connaissance ou encore des périodes de plusieurs jours associant faiblesse et perte d'appétit. (Day *et al.*, 1995) Sur le plan histologique, un hématome chronique peut présenter sur ses marges des cellules stromales prolifératives et une néovascularisation immature, pouvant mimer une tumeur vasculaire. L'absence de pléomorphisme cellulaire ou d'une activité mitotique anormalement élevée sont alors des indicateurs en faveur du diagnostic d'hématome. (Meuten, 2017) Autre difficulté, des hématomes sont souvent présents au sein des HSAs, en particulier s'ils sont de grande taille. Ainsi, une sélection peu soignée ou trop restrictive des pièces de recoupe d'une lésion splénique de nature vasculaire peut ne pas permettre un diagnostic de certitude à l'examen histologique, et faussement orienter vers un phénomène non tumoral.

Par ailleurs, il est également possible d'interpréter une portion bien différenciée d'un d'hémangiosarcome de type capillaire comme un tissu de granulation un peu atypique, et *vice versa*. (Görizt *et al.*, 2013)

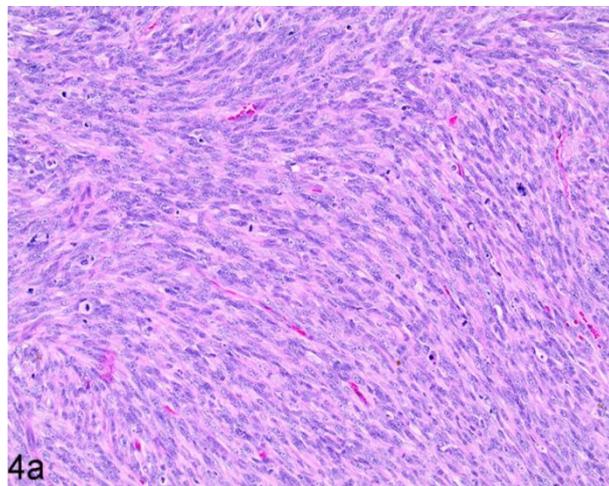
Dans certains cas, le diagnostic de tumeur vasculaire est évident mais la question de la malignité se pose. En effet, dans un contexte de prolifération vasculaire avec une faible densité de cellules, des atypies cyto-nucléaires peu marquées et un index mitotique très faible, le caractère bénin ou malin de bas grade du processus est incertain. Le diagnostic différentiel entre hémangiome et HSA peut donc s'avérer difficile. (Robinson and Robinson, 2016)

## 2. Diagnostic différentiel de néoplasies d'origine différente

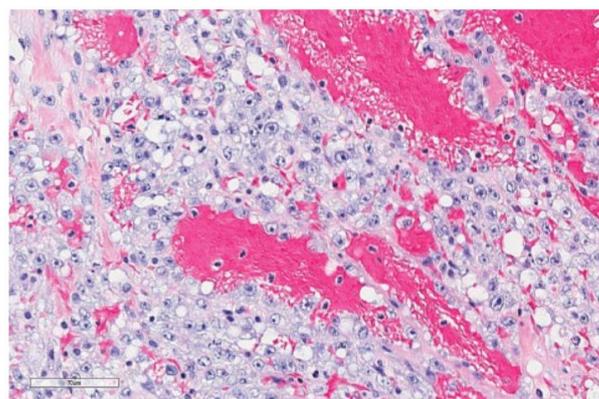
Par ailleurs, la distinction entre un hémangiosarcome et un autre type tumoral peut ne pas être évidente. En effet, plusieurs sources bibliographiques rapportent une confusion possible entre un HSA canin peu différencié, de mode de croissance solide ou présentant des cellules d'apparence inattendue (épithélioïdes, fusiformes...) avec d'autres tumeurs.

Un HSA splénique peut ressembler à un sarcome à cellules fusiformes (Robinson and Robinson, 2016) ou à d'autres sarcomes peu différenciés (Oksanen, 1978; Görizt *et al.*, 2013). Parmi ceux-ci, on trouve principalement des tumeurs spléniques appartenant au groupe des sarcomes non-angiogéniques, non-hématogéniques (Spangler *et al.*, 1994) récemment renommés sarcomes stromaux spléniques canins (Wittenberns *et al.*, 2021). Ces tumeurs stromales constituent un groupe de tumeurs d'origine mésenchymateuse comprenant entre autres des fibrosarcomes, des liposarcomes, des léiomyosarcomes, des sarcomes à cellules réticulées, ainsi que des sarcomes indifférenciés, ayant une origine cytogénésique non identifiée, suspectée être des cellules souches multipotentes. Toutes ces tumeurs présentent des caractéristiques architecturales et morphologiques proches : les cellules sont fusiformes à polygonales, parfois anaplasiques, contenant un ou plusieurs noyaux nucléolés, et semblent se développer dans la pulpe rouge. La tumeur est souvent invasive, formant des zones de nécrose. (Valli *et al.*, 2016) Un exemple de sarcome stromal splénique est visible sur la figure 15. Un HSA splénique solide peu différencié peut correspondre à cette description et être diagnostiqué à tort sarcome stromal. Si, à l'histologie, la présence de nombreuses hématies entre les faisceaux de cellules tumorales suggère plutôt un point de départ vasculaire de la tumeur (Robinson and Robinson, 2016), elle peut aussi être interprétée comme des hémorragies intra-tumorales (Meuten, 2017). Aussi, pour des sarcomes stromaux spléniques riches en hématies, l'immunohistochimie (IHC) prend toute son importance et permet d'asseoir le diagnostic histologique. (Valli *et al.*, 2016; Meuten, 2017; Wittenberns *et al.*, 2021)

En outre, les cellules endothéliales tumorales, notamment lorsqu'elles sont organisées en plages, peuvent prendre une morphologie de cellules rondes ou polyédriques, mimant ainsi une tumeur à cellules rondes. Parfois, au sein de ces plages sont présentes des structures tubulaires dont la lumière est tapissée par plusieurs couches de cellules polygonales ou cuboïdes à cylindriques, à cytoplasme pâle, éosinophile et parfois vacuolisé, et noyau central contenant un à deux nucléoles. Le stroma collagénique peut être plus ou moins dense, l'architecture de ce tissu tumoral prenant alors une apparence glandulaire. (Warren and Summers, 2007) Ces variants morphologiques, dont un exemple est visible sur la figure 16, sont rares et plutôt décrits dans le tissu sous-cutané. Cependant, ils ont tout de même déjà été observés dans la rate lors de cas d'HSAs épithélioïdes multicentriques. (Shor *et al.*, 2009; Gázquez *et al.*, 2012) Ce type d'HSA pose un piège diagnostique lié à une confusion possible avec un carcinome métastatique. Ce problème est connu dans l'espèce humaine (Miettinen, 2014; Machado *et al.*, 2021) et possiblement sous-estimé chez le chien.



**Figure 15 : Observation microscopique d'un sarcome stromal splénique de chien, coloré en HE.** Les cellules tumorales organisées en faisceaux ont une morphologie de cellules mésenchymateuses fusiformes, avec des limites cytoplasmiques mal délimitées, une anisocaryose et un index mitotique élevé. Grossissement inconnu. (Source : Wittenberns *et al.*, 2021)



**Figure 16 : Observation microscopique d'un hémangiosarcome épithélioïde cutané chez un chien, coloré en HE.** Les cellules tumorales sont polygonales et forment un tissu tubulaire semblable à une glande. Échelle : barre = 20 µm. (Source : Meuten, 2017)

### 3. Importance du diagnostic définitif

Le diagnostic histologique d'un hémangiosarcome peut donc être erroné. Or, compte-tenu de la variabilité de la prise en charge de l'animal et du pronostic annoncé au propriétaire selon l'origine de la tumeur, il est important de maximiser les chances de l'histopathologiste d'établir le bon diagnostic.

Le pronostic d'une lésion vasculaire varie beaucoup selon sa nature non tumorale, bénigne ou maligne. Ainsi, dans l'étude de *Spangler et Kass (1997)* portant sur 500 chiens présentant une pathologie splénique et subissant une splénectomie, les chiens porteurs de nodules d'hyperplasie lymphoïde ou d'hématomes présentaient 64 % de survie après un an, les chiens porteurs de tumeurs spléniques bénignes (dont des hémangiomes) avaient une survie de 74 % 11,7 mois après la chirurgie, alors que ceux porteurs d'un HSA avaient une survie à un an de 7 %. De plus, lorsque la splénomégalie nodulaire était imputable à une hyperplasie nodulaire ou à un hématome, la mort était moins souvent imputable au désordre splénique (21 % des cas), que lors d'hémangiosarcome (89 % des cas).

Concernant les sarcomes stromaux spléniques canins, avec lesquels les HSAs spléniques peuvent être confondus, la médiane de survie post-splénectomie est évaluée à 178 jours, soit environ trois mois, un chiffre un peu plus optimiste que ceux rapportés pour les HSAs pour lesquelles elle dépasse rarement un mois. Par ailleurs, la chimiothérapie adjuvante ne semble pas pour le moment offrir de bénéfices sur la médiane de survie de ces tumeurs, alors qu'elle peut l'étendre jusqu'à six mois dans le cas des HSAs. Ainsi, les auteurs proposent que toute tumeur splénique canine diagnostiquée comme sarcome stromal soit évaluée par immunohistochimie (IHC) afin de rechercher une éventuelle origine histiocytaire, lymphoïde ou vasculaire, les tumeurs provenant de ces types cellulaires ayant des traitements et des pronostics différents et mieux définis. (*Wittenberns et al., 2021*)

L'IHC peut en effet s'avérer un outil très utile à l'obtention d'un diagnostic juste et précis. La partie suivante s'applique donc à expliquer comment celle-ci peut être exploitée pour améliorer le diagnostic histologique des hémangiosarcomes spléniques canins.

## B. Place de l'immunohistochimie dans le diagnostic des tumeurs

### 1. Définition

L'immunohistochimie est une technique complémentaire de l'histologie classique, fréquemment utilisée et facile d'accès en routine. Le principe est d'utiliser des anticorps se fixant spécifiquement à des antigènes d'intérêt, c'est-à-dire des antigènes caractéristiques d'un certain type cellulaire ou d'une certaine structure histologique ou moléculaire, sur une coupe de tissu étalée sur une lame en verre. Ces anticorps sont visualisés grâce à une réaction chromogénique aboutissant à la formation d'un précipité insoluble coloré, ou grâce à un fluorochrome. Une contre-coloration, généralement à l'hémalum, permet de souligner l'architecture du tissu et ainsi de localiser l'antigène au sein de celui-ci. (*Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux, 2000; ABCAM, 2019; Magaki et al., 2019*)

L'IHC trouve de nombreuses applications dans le domaine de la cancérologie, notamment lors de l'établissement du diagnostic et du pronostic de la maladie. En effet, l'utilisation de marqueurs spécifiques de lignées cellulaires permet de déterminer précisément l'origine cytogénésique des cellules tumorales. En outre, lors de la recherche de métastases, le marquage des cellules tumorales permet de repérer plus facilement des embolus dans la lumière de vaisseaux périphériques de la tumeur primitive ou des micrométastases ganglionnaires, composées parfois d'une à trois cellules seulement. (Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux, 2000; Loreto and Caltabiano, 2021) Enfin, elle permet d'affiner le grading et donc de préciser le pronostic et la réponse potentielle à certains traitements. Par exemple, dans les mastocytomes cutanés canins, notamment de bas grade, la proportion de cellules exprimant le marqueur de prolifération Ki-67 est indicatrice du pronostic. (Sledge *et al.*, 2016)

## 2. Marqueurs d'intérêt pour le diagnostic des hémangiosarcomes

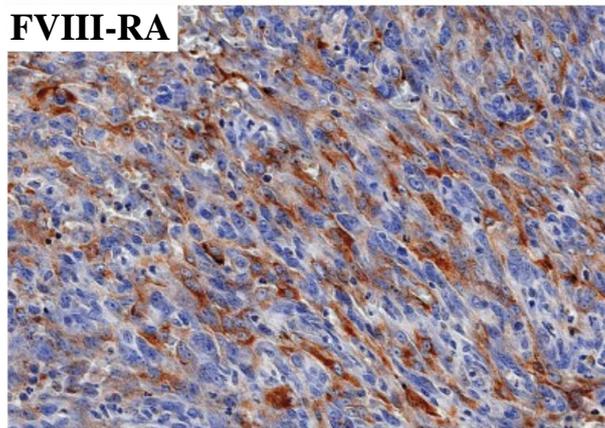
En médecine humaine, les marqueurs endothéliaux CD31, CD34 et ERG sont particulièrement utilisés pour le diagnostic des angiosarcomes, le marqueur ERG ayant d'ailleurs la préférence des pathologistes du centre anticancéreux Léon Bérard de Lyon. (Miettinen, 2014; Ranchère and Coindre, 2015) D'autres marqueurs endothéliaux sont utilisables : la podoplanine (anticorps D2-40), marqueur de la lignée endothéliale lymphatique également exprimé par certains angiosarcomes (Fukunaga, 2005), VE-cadhérine (VE-cadherin, Vascular Endothelial-Cadherin), VEGFR-1, 2 et 3 et FLI1 (Friend leukemia integration 1) (Machado *et al.*, 2021).

En médecine vétérinaire, les marqueurs utilisés dans le cadre du diagnostic de tumeurs vasculaires sont principalement le Factor VIII-related antigen (FVIII-RA, communément appelé Facteur VIII), CD31 et CD34. Le Facteur VIII est le plus utilisé en routine dans les laboratoires d'histopathologie vétérinaire. (Smith, 2003; Robinson and Robinson, 2016) Malheureusement, ces marqueurs sont imparfaits et l'interprétation des marquages peut être difficile. Cette partie s'applique à présenter les principaux marqueurs actuellement utilisés sur l'endothélium canin, leurs avantages et leurs inconvénients, ainsi que d'autres marqueurs potentiellement utiles.

### a. Factor VIII-related antigen

Le Facteur VIII, anciennement facteur de von Willebrand, est une glycoprotéine entrant dans la constitution des cellules endothéliales. (Smith, 2003) Son utilisation en IHC sur des tissus sains donne lieu à un marquage cytoplasmique diffus ou focal des cellules endothéliales, mais également des mégacaryocytes et des plaquettes, associé à un marquage diffus des thrombi et des zones hémorragiques ou nécrotiques. De manière inattendue, certains macrophages sont également marqués. (von Beust *et al.*, 1988; Ferrer *et al.*, 1995; Meuten, 2017)

Les cellules tumorales des hémangiomes sont la plupart du temps marquées lorsque l'on utilise un anticorps anti-Facteur VIII. Cependant, avec ce marquage, jusqu'à 40 % des HSAs sont négatifs (von Beust *et al.*, 1988; Gamlem and Nordstoga, 2008; Sabattini and Bettini, 2009) et les variants épithélioïdes sont associés à une positivité variable (Warren and Summers, 2007). Un cas d'HSA Facteur-VIII-positif est observable sur la figure 17.



**Figure 17 : Observation microscopique d'un hémangiosarcome splénique canin après immunohistochimie avec un anticorps anti FVIII-RA.** L'image montre la distribution cytoplasmique du marquage au sein des cellules tumorales. Grossissement inconnu. (Source : Meuten, 2017)

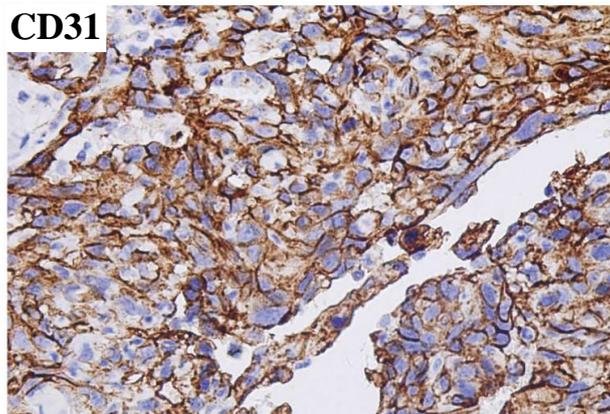
Sa sensibilité est limitée dans le cadre du diagnostic des HSAs humains (Miettinen *et al.*, 1994) et canins (Sabattini and Bettini, 2009; Göritz *et al.*, 2013), surtout lors de faible différenciation de la tumeur (von Beust *et al.*, 1988; Ferrer *et al.*, 1995). Un marquage négatif des cellules tumorales avec ce marqueur lors d'une suspicion d'HSA est peu informative et doit conduire à l'utilisation de marqueurs supplémentaires.

De plus, certains carcinomes montrent une réactivité inattendue au marquage du Facteur VIII, réduisant la spécificité de cet antigène, qui reste tout de même globalement très satisfaisante. (Ferrer *et al.*, 1995)

#### b. CD31

Le marqueur CD31 ou PECAM-1 (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) est une glycoprotéine transmembranaire retrouvée en surface des cellules endothéliales, des mégacaryocytes et des plaquettes, et parfois des histiocytes, des macrophages, de certaines populations lymphocytaires et plasmocytaires ou encore des cellules souches hématopoïétiques précoces. (Ferrer *et al.*, 1995; Gamlem and Nordstoga, 2008; Miettinen, 2014) Ses rôles comprennent entre autres l'adhésion des plaquettes à l'endothélium, l'activation des plaquettes, l'angiogenèse ou encore le maintien de l'intégrité des vaisseaux. (Ferrer *et al.*, 1995; Ramos-Vara *et al.*, 2018) En IHC, il produit un marquage cellulaire membranaire et cytoplasmique périphérique. (Bertazzolo *et al.*, 2005; Meuten, 2017) Contrairement au marquage du FVIII-RA, aucun marquage diffus d'arrière-plan n'est normalement observé dans les zones hémorragiques, et l'intensité du marquage obtenu est plus forte, rendant ainsi l'interprétation plus aisée. (Ferrer *et al.*, 1995)

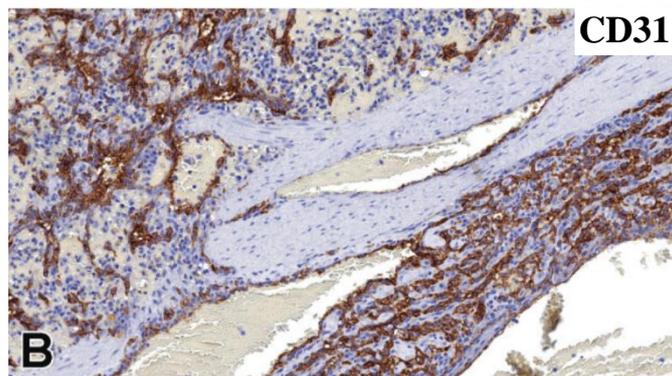
Chez l'Homme, il est notamment utilisé pour le diagnostic des tumeurs endothéliales, pour lesquelles il montre une expression quasi-systématique, même dans le cas de tumeurs présentant des spécificités morphologiques (tumeurs épithélioïdes ou pseudomyogéniques). (Miettinen, 2014; Schaefer and Hornick, 2018) (Figure 18) Cependant, le marquage de certaines cellules hématopoïétiques matures comme les plasmocytes et les histiocytes peut compliquer l'interprétation et entraîner un surdiagnostic de tumeurs endothéliales. En outre, la présence de CD31 sur les plaquettes, ces dernières pouvant adhérer à la surface des cellules tumorales, rend possible la détection de cet antigène sur les cellules tumorales, donnant ainsi l'impression fautive que ces dernières l'expriment et donc qu'elles ont une origine vasculaire. (Miettinen, 2014) De plus, certains sarcomes histiocytaires et parfois des carcinomes, des mésothéliomes ou d'autres sarcomes indifférenciés sont CD31-positifs. (De Young *et al.*, 1998; McKay *et al.*, 2012)



**Figure 18 : Observation microscopique d'un angiosarcome humain localisé dans le foie, après IHC avec un anticorps anti-CD31.** L'image montre la positivité des cellules endothéliales tumorales, ici intense, et illustre bien la distribution membranaire du marquage. Grossissement original : x300. (Source : Wang *et al.*, 2014)

Chez le chien, CD31 est décrit par plusieurs auteurs comme un marqueur très sensible des cellules endothéliales tumorales bénignes et malignes. (Ferrer *et al.*, 1995; Gamlem and Nordstoga, 2008) Un exemple d'HSA CD31-positif est visible sur la figure 19. L'intensité du marquage des HSAs est rapportée plus forte que celle des cellules endothéliales normales. (Kakiuchi-Kiyota *et al.*, 2020) Les HSAs épithélioïdes de l'étude de Warren *et Summers* (2007), localisés dans le derme, le tissu sous-cutané ou le muscle, sont également marqués, avec une intensité souvent forte mais parfois faible lors de l'utilisation d'un anticorps anti-CD31. Cependant, une autre étude conclut à une sensibilité plus faible de ce marqueur sur les HSAs spléniques canins, certains étant positifs au FVIII-RA et négatifs au CD31. (Görizt *et al.*, 2013)

Par ailleurs, bien que, chez le chien, le marquage CD31 soit très spécifique de l'endothélium et des cellules néoplasiques en dérivant (Ferrer *et al.*, 1995; Meuten, 2017), un marquage variable de carcinomes, notamment rénaux, ainsi que de plasmocytomes cutanés par CD31 a également été observé. Les mégacaryocytes et plaquettes, ainsi que les cellules épithéliales glomérulaires, les cellules épидидymaires et les cellules des canaux déférents sont également marquées à l'état sain. En outre, un marquage non systématique faible et d'intensité variable des hépatocytes normaux et de ceux présents dans les nodules d'hyperplasie a été rapporté. Une forte proportion des carcinomes hépatocellulaires est marquée par CD31, avec une intensité supérieure. (Meuten, 2017; Ramos-Vara *et al.*, 2018)



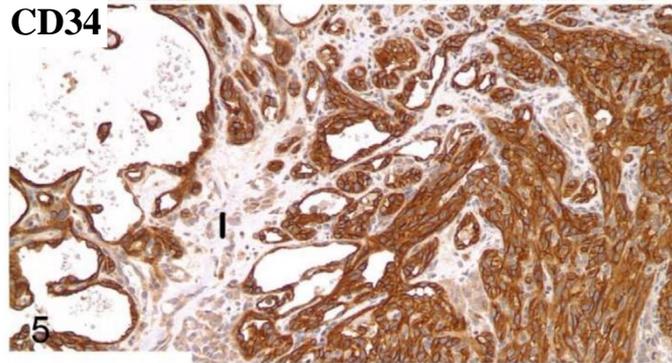
**Figure 19 : Observation microscopique d'un hémangiosarcome splénique canin après IHC avec un anticorps anti-CD31.** L'image montre la positivité des cellules endothéliales tumorales, ici intense, et illustre bien la distribution membranaire du marquage. Grossissement original : x200. (Source : Kakiuchi-Kiyota *et al.*, 2020)

### c. CD34

Le marqueur CD34 est un antigène exprimé principalement dans les cellules souches hématopoïétiques et les cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins, et moins intensément les cellules endothéliales tapissant les vaisseaux lymphatiques. Son expression est également observée dans les fibroblastes et les cellules épithéliales des follicules pileux. En immunohistochimie, il permet de marquer ces cellules avec une distribution membranaire. (Jennings *et al.*, 2012; Miettinen, 2014; Meuten, 2017)

Chez l'Homme, CD34 est utilisé en IHC pour le diagnostic de certaines tumeurs fibroblastiques et lipomateuses. Il permet également un marquage des cellules endothéliales des tumeurs vasculaires bénignes, mais est associé à une faible sensibilité (50-60 %) sur les tumeurs vasculaires malignes. (Miettinen, 2014) De plus, il manque également de spécificité du fait de son expression assez large dans les tissus mésenchymateux normaux et possible dans d'autres sarcomes peu différenciés. (McKay *et al.*, 2012)

Chez le chien et le chat, il marque les cellules endothéliales tumorales tapissant les vaisseaux sanguins mais sa spécificité est faible. (Jennings *et al.*, 2012; Meuten, 2017) De plus, bien qu'il soit exprimé dans la majorité des HSAs canins, l'intensité du marquage est variable, pouvant aller de faible à forte, alors qu'il est uniformément de forte intensité dans l'endothélium normal. (Kakiuchi-Kiyota *et al.*, 2020) Ces différents aspects font qu'il n'est donc pas utilisé en priorité lors de suspicion d'HSA ou lors de recherche de l'origine d'un sarcome peu différencié. (Jennings *et al.*, 2012) Une image d'HSA CD34-positif de chat est visible sur la figure 20.



**Figure 20 : Observation microscopique d'un hémangiosarcome du côlon chez un chat après IHC avec un anticorps anti-CD34.** L'image montre un marquage intense et de distribution membranaire des cellules endothéliales tumorales, ainsi qu'un marquage diffus en arrière-plan (I). L'observation est similaire au résultat attendu lors du marquage CD34 d'un HSA canin. Grossissement inconnu. (Source : Jennings *et al.*, 2012)

#### d. Autres marqueurs

Lors de tumeur peu différenciée, l'utilisation en première intention d'un marqueur permettant d'identifier l'origine embryologique générale de la tumeur (épithéliale, mésenchymateuse, musculaire ou nerveuse) peut être recommandée avant l'utilisation de marqueurs endothéliaux spécifiques. Dans le cas d'une tumeur peu différenciée suspectée d'être d'origine endothéliale, l'utilisation d'un anticorps anti-vimentine, un marqueur ubiquitaire des cellules mésenchymateuses, permettra de confirmer la nature mésenchymateuse du néoplasme. Cependant, le marquage de certains carcinomes par un anticorps anti-vimentine est parfois observé (phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse), ce qui rend utile en cas de doute l'utilisation d'anticorps anti-kératine, marqueurs spécifiques d'une origine épithéliale. (Sabattini and Bettini, 2009; Meuten, 2017) Contrairement à l'Homme (Machado *et al.*, 2021), le marquage de tumeurs vasculaires par des cytokératines n'est pas rapporté chez le chien, même lors d'HSA épithélioïde. (Warren and Summers, 2007) Un marquage positif à la vimentine et négatif aux cytokératines laisse donc peu de doute quant à l'origine mésenchymateuse des cellules.

D'autres marqueurs ont été relevés comme potentiellement intéressants pour identifier les tumeurs vasculaires canines. Par exemple, la claudine-5, protéine transmembranaire qui entre dans la composition des jonctions serrées de l'endothélium, est présente dans les cellules endothéliales normales, les hémangiomes, les HSAs et les lymphangiomes, et n'a pas été observée dans d'autres tumeurs à cellules fusiformes. (Meuten, 2017) Le facteur du complément C7, une glycoprotéine membranaire entrant dans la composition du Complexe d'Attaque Membranaire, et exprimée dans les cellules endothéliales et les hépatocytes, constitue un autre marqueur potentiellement intéressant pour l'identification des HSAs. (Langegegn *et al.*, 2001; Oungsakul *et al.*, 2021) Mais ces différents marqueurs, autres que les trois précédemment développés (FVIII-RA, CD31, CD34), nécessiteraient des études complémentaires longues pour valider leur usage sur l'endothélium et ses tumeurs.

Les marqueurs précédemment présentés ne sont d'aucune utilité pour évaluer le degré de malignité des tumeurs endothéliales. Une étude de *Sabattini et Bettini (2009)* aborde deux marqueurs pouvant potentiellement répondre à cette problématique. En effet, ils observent une expression significativement plus importante des marqueurs CD44 et CD117 dans les hémangiosarcomes par rapport à leur expression dans les hémangiomes. Dans le cas de CD44, cependant, son expression dans les cellules endothéliales tumorales des HSAs n'est pas significativement différente de son expression dans les cellules endothéliales normales des tissus de granulation. De plus, il est à noter que ces marqueurs, étant exprimés dans de nombreuses autres tumeurs, ne permettent pas de prouver la nature endothéliale des cellules positivement marquées.

#### e. Conclusion

Un récapitulatif des trois principaux marqueurs des HSAs canins est présenté dans le tableau V. Ces marqueurs ont le mérite d'apporter une aide au pathologiste dans l'établissement du diagnostic d'HSA. Cependant, leurs sensibilités et spécificités sont imparfaites, et leur recours doit rester raisonné, et toujours en complément d'une analyse histologique classique.

Certains auteurs ont cherché une explication à la plus grande hétérogénéité dans le marquage des cellules endothéliales spléniques tumorales comparé au marquage des cellules endothéliales observé sur des coupes de rate normale. Ils concluent que les antigènes sont moins bien préservés, ou que leur synthèse et/ou que leur répartition dans la cellule sont modifiées dans les cellules tumorales en comparaison avec cellules endothéliales saines. (*Göritz et al., 2013*) Par ailleurs, il a été montré que la présence d'atypies cytonucléaires dans les cellules tumorales est négativement corrélée à l'intensité du marquage obtenu avec des anticorps anti-FVIII-RA et anti-CD31 (*Maharani et al., 2018*), ce qui laisse supposer que plus la morphologie des cellules tumorales s'éloigne de celle de la cellule normale d'origine, plus leur biologie diverge, d'où la perte de protéines normalement exprimées par ces cellules.

Finalement, le marquage CD31 semble être le plus performant en termes de sensibilité. Celui-ci pourrait donc être utilisé seul en première intention. Cependant, du fait de sa spécificité imparfaite, on pourrait observer un marquage positif pour une tumeur qui n'a pas une origine endothéliale. Un marquage complémentaire avec un anticorps anti-FVIII-RA (moins sensible mais plus spécifique) pourrait être ajouté lors de positivité avec le CD31, afin de confirmer l'origine endothéliale. L'association de ces deux marqueurs semble donc à première vue satisfaisante pour obtenir un diagnostic précis. Malgré tout, les faiblesses respectives de ces marqueurs ne se compensent pas systématiquement, et certains cas restent complexes à interpréter. En effet, des cellules tumorales pourraient se trouver marquées par CD31, mais négatives au marquage FVIII-RA. Dans ce cas, deux interprétations opposées pourraient être formulées. La première consiste à conclure que ces cellules sont endothéliales, mais que la faible sensibilité du marquage FVIII-RA entraîne sa négativité. Cependant, il pourrait également s'agir d'une tumeur non endothéliale exprimant CD31. Ainsi, un autre marqueur capable de donner une réponse à des cas douteux comme celui-ci serait le bienvenu.

<b>Tableau V : Comparaison des marqueurs endothéliaux utilisés dans le diagnostic immunohistochimique des hémangiosarcomes canins</b>			
<b>Marqueur</b>	<b>FVIII-RA</b>	<b>CD31</b>	<b>CD34</b>
<b>Localisation du marquage</b>	Cytoplasmique	Membranaire	Membranaire
<b>Cellules marquées</b>	Cellules endothéliales, mégacaryocytes, plaquettes ; Marquage diffus des thrombi et zones hémorragiques et nécrotiques	Cellules endothéliales, possiblement mégacaryocytes et plaquettes, hépatocytes, cellules épithéliales rénales et épидидymaires	Cellules souches hématopoïétiques, cellules endothéliales, fibroblastes, follicules pileux
<b>Points forts</b>	Spécificité élevée	Sensibilité élevée ; absence de marquage diffus d'arrière-plan	Sensibilité élevée
<b>Points faibles</b>	Sensibilité limitée pour les hémangiosarcomes ; marquage diffus en arrière-plan	Spécificité moyenne à élevée : marquage de carcinomes rénaux et hépatocellulaires	Spécificité faible : marquage de nombreuses tumeurs notamment mésenchymateuses ; Intensité du marquage variable

### C. Le marqueur ERG, un outil potentiel de diagnostic des tumeurs vasculaires spléniques canines

En 2011, *Miettinen et al.* valident chez l'Homme l'utilisation par immunohistochimie d'un anticorps anti-ERG (E-26 transformation specific-related gene) comme marqueur pour aider au diagnostic des tumeurs vasculaires. Le marquage d'ERG, un facteur de transcription notamment présent dans les cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins, est, depuis, un outil régulièrement utilisé en médecine humaine avec diverses applications. (Ranchère and Coindre, 2015) Chez le chien, en revanche, ERG n'est à ce jour pas utilisé et la possibilité de transposer ses indications à la médecine vétérinaire reste à explorer.

L'objectif de cette dernière partie bibliographique est de présenter la protéine ERG, ses utilisations comme marqueur en médecine humaine et les raisons qui amènent à penser qu'il pourrait être appliqué à l'espèce canine.

## 1. Présentation de la protéine ERG

### a. Famille des facteurs de transcription ETS

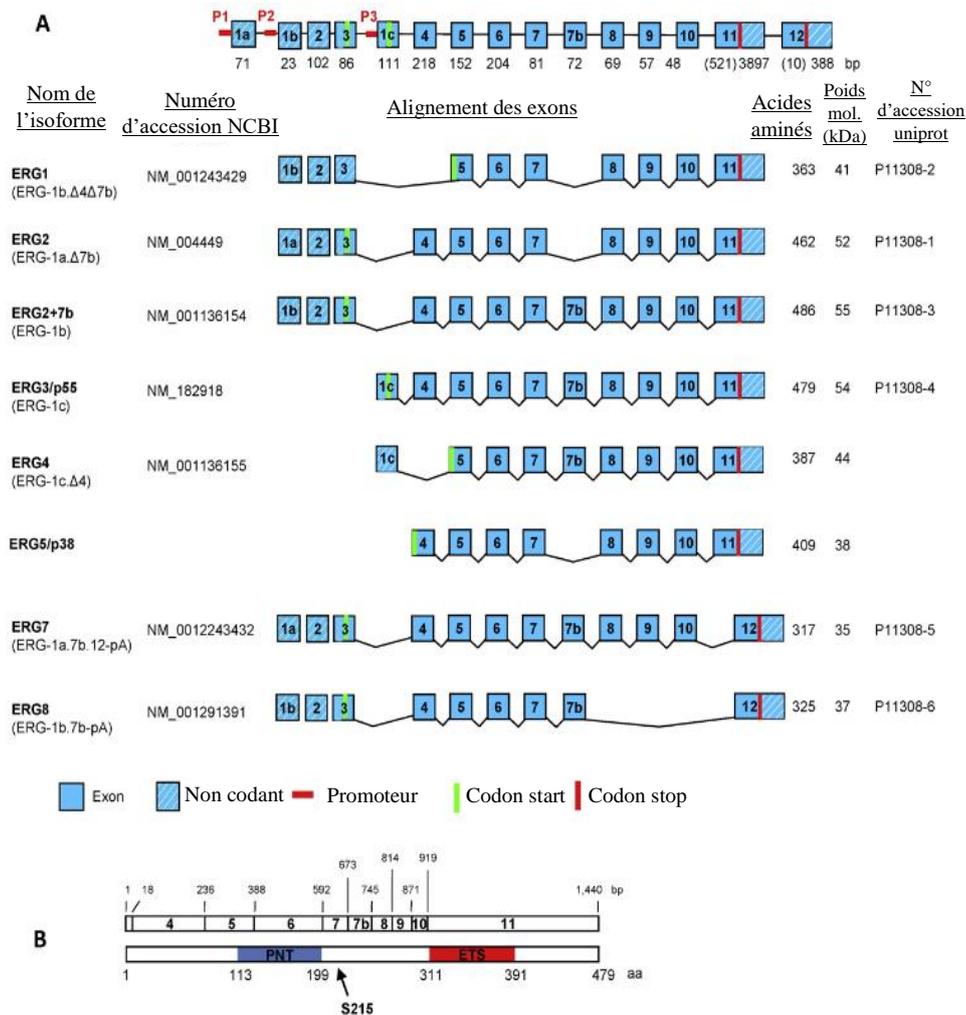
La protéine ERG est un facteur de transcription appartenant à la famille des facteurs ETS (E-26 transformation specific). Chez l'Homme, cette famille comprend 28 membres, tous caractérisés par un domaine de liaison à l'ADN hélice-tour-hélice de 85 acides aminés, hautement conservé : le domaine ETS. Sa séquence cible sur l'ADN correspond à un motif consensus riche en purine, de 15 à 20 paires de bases, avec une séquence centrale 5' GGA(A/T) 3'. Un autre domaine conservé dans certains de ces facteurs de transcription est le domaine pointu (PNT domain) d'environ 80 acides aminés, permettant l'interaction d'ERG avec d'autres protéines régulatrices, telles que des kinases, ou la dimérisation avec d'autres facteurs ETS. (Shah *et al.*, 2016)

Les facteurs ETS peuvent agir comme activateurs transcriptionnels, répresseurs ou les deux, en fonction du gène cible et des modifications post-traductionnelles. Leur expression est variable au cours du temps : certains ne sont exprimés que pendant le développement embryonnaire alors que d'autres, comme ERG, restent exprimés à l'âge adulte. Enfin, certains sont exprimés en réponse à des signaux favorisant l'inflammation ou la croissance cellulaire. (Lorenzin and Demichelis, 2022) Chez l'Homme, au moins 19 facteurs ETS sont exprimés par les cellules endothéliales à un moment donné de la vie. (Shah *et al.*, 2016)

De même, l'expression tissulaire des facteurs ETS varie : certains, comme ELK-1, sont omniprésents et interviennent dans diverses fonctions cellulaires, y compris la croissance, la différenciation, la prolifération et les interactions cellulaires. D'autres, comme ETS-1, ERG et FLI-1, ont un profil d'expression restreint et sont importants dans la régulation des processus spécifiques aux tissus, notamment l'hématopoïèse, l'angiogenèse et inflammation vasculaire. Plusieurs facteurs ETS dont ERG peuvent agir comme proto-oncogènes et ont été identifiés comme impliqués dans la pathogenèse de différents cancers. (Shah *et al.*, 2016)

### b. Structure et isoformes d'ERG

Chez l'Homme, le gène *ERG* est localisé sur le chromosome 21 (21q.22.2) et couvre 282 kilobases (kb). Il est constitué d'au moins 17 exons et 16 introns, et possède au moins trois promoteurs proximaux reconnus. De plus, une région de 85 kb en aval du site d'initiation de la transcription a été identifiée comme activatrice de la transcription d'*ERG*. Ce site serait actif pendant l'hématopoïèse normale ainsi que dans les leucémies aiguës à cellules T. (Hoesel *et al.*, 2016) En plus de ses trois promoteurs, *ERG* contient deux sites d'épissage, trois sites de polyadénylation distincts et une variété de sites de début de traduction différents, résultant en environ 30 variants d'ERG possibles, dont seul un sous-ensemble de huit isoformes est généralement exprimé au niveau protéique. (Zammarchi *et al.*, 2013) Ces isoformes sont schématisées sur la figure 21.



**Figure 21 : Structure du gène *ERG* et des isoformes protéiques qu'il code. A :** La structure du gène *ERG* est représentée avec ses trois promoteurs alternatifs (P1, P2, P3) et la taille des exons en paires de bases (bp) est indiquée pour chacun. La structure des isoformes *ERG* est ensuite représentée. **B :** Les positions des domaines PNT et ETS sont représentées par rapport à la séquence d'*ERG3/p55*. (Modifié d'après Shah *et al.*, 2016)

La protéine la plus longue comprend 486 acides aminés et présente une masse moléculaire 54,6 kiloDaltons (kDa). Les isoformes *ERG1*, *ERG2*, *ERG3* (p55), *ERG4* (p49) et *ERG5* (p38) sont bien caractérisées et correspondent aux protéines fonctionnelles qui se lient à l'ADN. (Hoesel *et al.*, 2016) Ces protéines possèdent en effet le domaine ETS C-terminal, qui permet la liaison à l'ADN sur la séquence 5'-ACC(GGAA)GT-3'. Les régions de part et d'autre du domaine ETS possèdent une activité inhibitrice par diminution de l'affinité pour l'ADN. Le domaine ETS de la protéine *ERG* permettrait également l'interaction avec la protéine activatrice 1, un facteur de transcription hétérodimérique composé des protéines FOS et JUN. (Shah *et al.*, 2016) Un domaine PNT, qui caractérise la partie centrale de la protéine *ERG*, comprend quatre hélices  $\alpha$  et permettrait l'interaction avec d'autres facteurs ETS. En effet, les protéines *ERG* ont la capacité de former des complexes homo et hétérodimères *in vitro* avec d'autres facteurs ETS comme FLI-1, ETS-2 et PU-1. (Carrère *et al.*, 1998) Cependant, l'homodimérisation d'*ERG* semble incompatible avec la liaison à l'ADN et la régulation transcriptionnelle. (Shah *et al.*, 2016)

L'isoforme ERG8 diffère considérablement des autres : elle ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN et présente une extrémité C-terminale très différente des autres isoformes. Ainsi, celle-ci ne peut pas se lier à l'ADN et est principalement localisée dans le cytoplasme. Sa fonction serait donc particulière : elle interagirait avec d'autres isoformes d'ERG, causant l'inhibition de leur activité transcriptionnelle. En effet, il a été démontré que la suppression d'ERG8 par interférence ARN (siRNA : small interfering ribonucleic acid) entraîne une augmentation du niveau d'ERG actif dans les cellules endothéliales primaires, suggérant un mécanisme de rétrocontrôle négatif impliquant ERG8 et les isoformes transcriptionnellement actives. (Hoesel *et al.*, 2016)

Finalement, la protéine ERG n'est pas un unique facteur de transcription bien défini, mais plutôt une famille de protéines résultant d'un épissage alternatif, de l'existence de différents codons de départ et de sites de polyadénylation. Ces différentes isoformes sont suspectées avoir des fonctions différentes, ce qui expliquerait les différentes actions d'ERG dans des types cellulaires distincts.

### c. Expression de la protéine ERG

Chez la souris, la protéine ERG est détectée au cours du développement embryonnaire dans les tissus mésodermiques, où elle permet le développement de l'endothélium, ainsi que dans le cartilage, le myocarde et les tissus hématopoïétiques, à l'exception des lymphocytes. Elle n'est en revanche pas exprimée dans les épithéliums. Lors du développement embryonnaire, ERG constitue une protéine essentielle. En effet, une souris dont l'expression d'ERG est bloquée par knock-out ne se développe pas au-delà du stade embryonnaire, principalement en raison d'anomalies du développement cardio-vasculaire. (Lorenzin and Demichelis, 2022)

L'expression d'ERG diminue après la naissance mais, chez l'Homme et la souris, la protéine reste fortement présente dans les cellules endothéliales de la plupart des tissus adultes et dans les cellules hématopoïétiques. ERG est notamment impliquée dans l'homéostasie vasculaire et l'angiogenèse. Des études génomiques ont également montré qu'ERG est le facteur ETS le plus produit dans les cellules endothéliales quiescentes, à des niveaux similaires dans les endothéliums artériels, veineux et micro-vasculaires. (Shah *et al.*, 2016)

Concernant la localisation de la protéine ERG à l'échelle subcellulaire, celle-ci se trouve dans le noyau des cellules qui l'expriment. Cependant, la plupart des études relatant cette observation sont basées sur des IHC réalisées avec des anticorps anti-ERG reconnaissant les épitopes dans l'extrémité C-terminale de la protéine, absente dans l'isoforme ERG8. L'utilisation d'un anticorps ciblant la partie N-terminale (clone 9FY) permet en revanche de mettre en évidence cette isoforme localisée dans le cytoplasme. (Hoesel *et al.*, 2016)

#### d. Activation de la protéine ERG

L'activité de nombreux facteurs ETS est régulée par des cascades de signalisation aboutissant à des modifications post-traductionnelles de ces derniers, induisant des changements de leur localisation subcellulaire, de leur activité de liaison à l'ADN, et/ou de leur activité transcriptionnelle. Peu de faits sont connus sur les modifications post-traductionnelles d'ERG dans les cellules endothéliales. Dans les myéloblastes, ERG est phosphorylée sur un résidu sérine par un activateur de la voie de la protéine C kinase. Plus récemment, il a été montré dans des cellules endothéliales que l'activité transcriptionnelle d'ERG pouvait être régulée par la voie VEGF/RAS/MAPK. Or, les MAP kinases sont connues pour phosphoryler d'autres membres de la famille ETS, et ainsi affecter leurs capacités de liaison à l'ADN et d'interactions avec d'autres facteurs de transcription. (Shah *et al.*, 2016; Lorenzin and Demichelis, 2022)

Cette voie d'activation RAS/MAPK est particulièrement importante dans le développement de cancers chez l'Homme. En effet, ERK2, une kinase appartenant à cette cascade de signalisation, phosphoryle ERG au niveau des sérines 96, 215 et 283. La phosphorylation de la sérine 283 est exclusivement détectée dans les cellules leucémiques, et associée à une liaison accrue d'ERG aux éléments régulateurs des gènes contribuant au phénotype malin de la leucémie. La phosphorylation des sérines 96 et 215, quant à elle, est plutôt observée dans les cellules cancéreuses de la prostate. Une étude *in vitro* a montré que la sérine 215 phosphorylée induit un changement conformationnel d'ERG, amorçant la phosphorylation ultérieure de la sérine 96. Cette deuxième modification diminue l'affinité d'ERG pour EZH2, favorisant la migration cellulaire des cellules tumorales. (Lorenzin and Demichelis, 2022)

#### e. Fonction de la protéine ERG

Malgré le fait que le gène *ERG* soit exprimé sous des isoformes distinctes avec des fonctions potentiellement différentes, la protéine ERG est considérée comme une entité unique d'un point de vue fonctionnel. (Hoesel *et al.*, 2016)

La protéine ERG est produite en quantité importante dans l'endothélium où elle exerce diverses fonctions liées à la différenciation et à l'homéostasie de ces cellules. Plus précisément, elle active la formation du système vasculaire durant l'embryogenèse ainsi que l'angiogenèse physiologique et pathologique. Elle régule également l'apoptose endothéliale. (Birdsey *et al.*, 2008, 2012, 2015) Elle contrôle notamment la différenciation des cellules endothéliales en pilotant l'expression des gènes qui leur sont spécifiques, tels que *VE-cadhérine*, *vWF*, *endogline* et *eNOS*. (Nikolova-Krstevski *et al.*, 2009) Elle joue également un rôle clé dans le maintien de l'intégrité des jonctions intercellulaires endothéliales en régulant la transcription de molécules les composant, telles que *VE-cadhérine*, *claudine-5* et *ICAM-2*. (Birdsey *et al.*, 2008)

Le facteur ERG intervient également dans la maturation et la stabilisation des vaisseaux, notamment via la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, activant la migration cellulaire. Une étude transcriptomique sur des cellules endothéliales ERG-déficientes a permis de détecter plus de 80 gènes régulés par ERG et impliqués dans cette fonction, dont de nombreux régulateurs de la famille des Rho GTPases. (Yuan *et al.*, 2011; Birdsey *et al.*, 2015; Shah *et al.*, 2017)

Enfin, la protéine ERG réprime l'inflammation vasculaire. (Shah *et al.*, 2016) En effet, elle maintient l'endothélium dans un état anti-inflammatoire en réprimant l'expression de molécules pro-inflammatoires comme ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1), VCAM (Vascular cell adhesion protein), l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI)-1 et IL-8. De plus, l'expression d'*ERG* est réprimée par des stimuli inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ), le LPS (Lipopolysaccharide) ou l'interleukine-1 $\beta$ . ERG est également capable d'inhiber *in vitro* l'adhésion des leucocytes à la paroi vasculaire et leur transmigration. *In vivo*, le rôle anti-inflammatoire d'*ERG* a été démontré par un modèle d'inflammation aiguë chez la souris, où la surexpression d'*ERG* dans la patte a fortement diminué son gonflement induit par le TNF- $\alpha$ . (Hoesel *et al.*, 2016)

En plus de son rôle bien établi dans l'angiogenèse et le développement et maintien d'un système vasculaire sain, ERG intervient dans d'autres mécanismes biologiques non liés au système vasculaire. Parmi ceux-ci, on compte l'hématopoïèse. La protéine ERG est ainsi présente dans les cellules de la lignée myéloïde, telles que les mégacaryocytes, permettant le maintien du nombre de plaquettes sanguines. *ERG* est également exprimé transitoirement dans les lignées lymphocytaires au cours de leurs premiers stades de différenciation. Son expression est cependant inactivée après leur engagement dans les lignées cellulaires T et B. Il a été montré qu'une surexpression d'*ERG* dans les lymphocytes T et B en modifie la différenciation, favorisant ainsi la croissance des cellules précurseurs immatures. Enfin, ERG régule par ailleurs les programmes liés à l'auto-renouvellement des cellules souches.

En outre, ERG intervient dans l'ostéogenèse et le développement du cartilage lors de l'embryogenèse. Initialement, l'expression d'*ERG* a été mise en évidence dans des articulations synoviales des membres d'embryons de poulet. D'autres études ont montré qu'*ERG* est sélectivement exprimé dans les chondrocytes articulaires au cours du développement osseux de la souris et du poulet. Cependant, la surexpression d'*ERG* lors du développement des membres du poussin bloque la maturation des chondrocytes. (Shah *et al.*, 2016)

#### f. ERG et oncogenèse

Outre son rôle physiologique, la protéine ERG est également produite de manière aberrante, soit seule, soit fusionnée à d'autres protéines dans divers cancers. En cancérologie humaine, le gène *ERG* est ainsi connu pour son rôle oncogénique. Par exemple, une région activatrice de la transcription d'*ERG* nommée « +85 enhancer », localisée en aval du quatrième exon, est stimulée dans la leucémie lymphoblastique T aiguë par la liaison de facteurs de transcription. L'accroissement de l'expression d'*ERG* qui en résulte est associée à une prolifération croissante des cellules leucémiques. Dans ces tumeurs, la présence d'*ERG* est associée à une multiplication par quatre du risque de rechute. (Adamo and Ladomery, 2016)

Cependant, *ERG* est surtout connu en médecine humaine pour son implication dans le cancer de la prostate, pour lequel il est l'oncogène le plus fréquemment exprimé. À l'état sain, *ERG* n'est que peu exprimé par les cellules épithéliales prostatiques. Son expression par les cellules cancéreuses, résultant d'une fusion génétique entre le promoteur du gène *TMPRSS2* (transmembrane protease serine 2) et *ERG*, a lieu dans environ la moitié des cas de carcinome prostatique. Elle est à l'origine de l'activation ou la répression de nombreux autres gènes et voies de signalisation impliqués dans des mécanismes oncogéniques. Cette fusion est suspectée être un événement précoce de la carcinogénèse, augmentant le risque de transformation en carcinome lorsqu'elle intervient dans un tissu hyperplasique. De plus, la présence du facteur ERG dans les cellules tumorales est associée à une dédifférenciation globale des cellules (quantifiée par un système nommé « score de Gleason »), la promotion de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT : Epithelial-Mesenchymal transition) des cellules tumorales et la progression de la tumeur. Cliniquement, ses effets se traduisent statistiquement par un stade clinique plus avancé, la présence de métastases, et une médiane de survie apparemment réduite, bien que la valeur pronostique de cet oncogène reste à éclaircir au vu de résultats contradictoires dans certaines études. (Adamo and Lodomery, 2016; Khosh Kish *et al.*, 2022; Lorenzin and Demichelis, 2022)

Plus précisément, deux mécanismes peuvent conduire à la fusion *TMPRSS2:ERG* : une translocation chromosomique ou une délétion. Dans la plupart des cas, ces événements sont secondaires à une exposition à long terme aux androgènes. La protéine TMPRSS2 est une protéase transmembranaire exprimée dans la prostate à l'état normal, et retrouvée dans la membrane des cellules épithéliales sécrétoires apicales, des cellules basales, dans la lumière des glandes ainsi que dans la semence. Son promoteur étant régulé par des androgènes, la fusion de celui-ci avec *ERG* induit une surexpression de la protéine en présence de ces hormones, expliquant son expression ectopique dans les cellules épithéliales prostatiques. Une seule ou de multiples copies du gène *ERG* peuvent être présentes au site de fusion. Dans le second cas, la quantité de protéines ERG produites est plus importante. En outre, une boucle d'autorégulation intervient secondairement : le facteur ERG active sa propre transcription au niveau du chromosome non transloqué, en se liant à des motifs ETS dans son promoteur. Le rétrocontrôle positif ainsi créé entraîne une augmentation de la quantité de facteur ERG dans les cellules. Par ailleurs, l'activité oncogénique d'ERG peut être accrue par des modifications post-transcriptionnelles de la protéine. C'est le cas lors de méthylation de la lysine 263 de la protéine, catalysée par EZH2 (enhancer of zeste homolog 2), qui promeut la liaison d'ERG à l'ADN. L'augmentation de la quantité de facteur ERG et l'accroissement de son activité sont tous deux associés à des facteurs péjoratifs de la maladie. (Adamo and Lodomery, 2016; Khosh Kish *et al.*, 2022)

De nombreux mécanismes déclenchés par la présence d'ERG dans les cellules tumorales prostatiques humaines sont caractérisés. Ceux-ci sont à l'origine de différents effets tout au long de la genèse et de la progression de la tumeur. Plusieurs exemples peuvent être cités :

- ❖ La carcinogenèse de cellules non encore tumorales. ERG joue notamment un rôle déclencheur de la transformation des cellules épithéliales lors de la transition entre néoplasie prostatique intraépithéliale (PIN : Prostatic intraepithelial neoplasia), un stade prolifératif précurseur des tumeurs malignes prostatiques, et carcinome prostatique.
- ❖ ERG promeut la dédifférenciation des cellules tumorales, une caractéristique associée à leur agressivité. En effet, le facteur de transcription ERG induit la répression de gènes spécifiques de l'épithélium prostatique, tel que *KLK3* codant l'antigène spécifique de prostate (PSA), et l'acquisition de marqueurs de cellules souches normalement exprimés dans la couche basale de l'épithélium prostatique, tels que CD49F, dans les cellules épithéliales tumorales. Par ailleurs, ERG active entre autres *C-MYC*, un oncogène connu pour son rôle dans la progression du cancer prostatique, qui promeut la dédifférenciation des cellules tumorales prostatiques. Le maintien des cellules tumorales dans un état dédifférencié est également la conséquence d'un mécanisme de grande importance dans le cancer prostatique : une interrelation transcriptionnelle entre *ERG* et le récepteur des androgènes (AR : Androgen receptor), modulée par des mécanismes épigénétiques. Ces interactions conduisent, de façon simplifiée, à une modification de l'action du récepteur des androgènes sur ses différentes cibles, perturbant son action de différenciation de l'épithélium prostatique selon différentes lignées.
- ❖ La surexpression d'*ERG* dans les cancers est en outre associée à l'acquisition par les cellules cancéreuses de la capacité à métastaser. Le facteur ERG active, entre autres, la transcription des gènes *FZD4* et *vimentine* ou encore la voie de signalisation Wnt, impliqués dans l'EMT des cellules tumorales, un mécanisme clé impliquant la perte de caractéristiques de cellules épithéliales (polarité apico-basale, structures d'adhérence) et l'obtention de caractéristiques de cellules mésenchymateuses permettant la migration. Plusieurs autres mécanismes par lesquels ERG stimule l'activité métastatique sont clairement identifiés dans le carcinome prostatique. Par exemple, ERG active la production de CXCR4 (Chemokine (CXC motif) Receptor 4), un récepteur membranaire d'une chémokine nommée « stromal-derived factor 1 », dans 80 % des cancers prostatiques. La liaison du ligand au récepteur induit la migration métastatique des cellules tumorales l'exprimant vers le tissu osseux. Par ailleurs, ERG interagit avec la protéine EWS (Ewing sarcoma protein), recrutée comme co-facteur de transcription, afin d'induire la migration et la croissance indépendante d'un support d'ancrage des cellules tumorales.

Ainsi, ERG déclenche une multitude de mécanismes dans le cancer de la prostate. À l'heure actuelle, des réflexions sont menées afin de l'exploiter comme outil diagnostique ou cible thérapeutique, de manière à contrer ses différents effets sur la progression du cancer. (Lorenzin and Demichelis, 2022)

On observe également des fusions génétiques d'*ERG* dans d'autres tumeurs. (Shah *et al.*, 2016) Le sarcome d'Ewing, une tumeur osseuse primaire, hautement métastatique, affectant principalement les adolescents et les jeunes adultes, fait intervenir une fusion des gènes *ERG* et *EWS* dans 15 % des cas, secondairement à une translocation chromosomique. Les conséquences précises de cet événement dans la genèse de la tumeur sont peu documentées. Cependant, la fusion du gène *EWS* avec celui d'un autre facteur de transcription de la famille ETS, *FLII*, est plus fréquente (80 % des cas) et mieux connue. La protéine fusionnée ainsi produite présente une activité de facteur de transcription aberrante, suspectée jouant un rôle dans la pathogénie du sarcome. (Durer and Shaikh, 2022) La fusion *EWS:ERG* est associée à une présentation clinique semblable à celle observée lors de fusion *EWS:FLII*. (Ginsberg *et al.*, 1999) Par ailleurs, plusieurs fusions du gène *ERG* peuvent intervenir dans la leucémie myéloïde aiguë. Une fusion avec *ELF4*, un gène codant un autre facteur de transcription ETS, résulte d'une expression accrue d'*ERG*, sous le contrôle du promoteur d'*ELF4*. Une autre translocation, rare, est à l'origine d'une fusion *FUS/TLS:ERG*, codant une protéine chimère capable d'interagir avec l'ADN, de perturber la différenciation de la lignée myéloïde et d'activer la prolifération cellulaire, rendant les cellules plus sujettes à une transformation tumorale. De façon globale, une surexpression d'*ERG* est fréquente dans les leucémies myéloïdes aiguës, et de pronostic défavorable. (Martens, 2011)

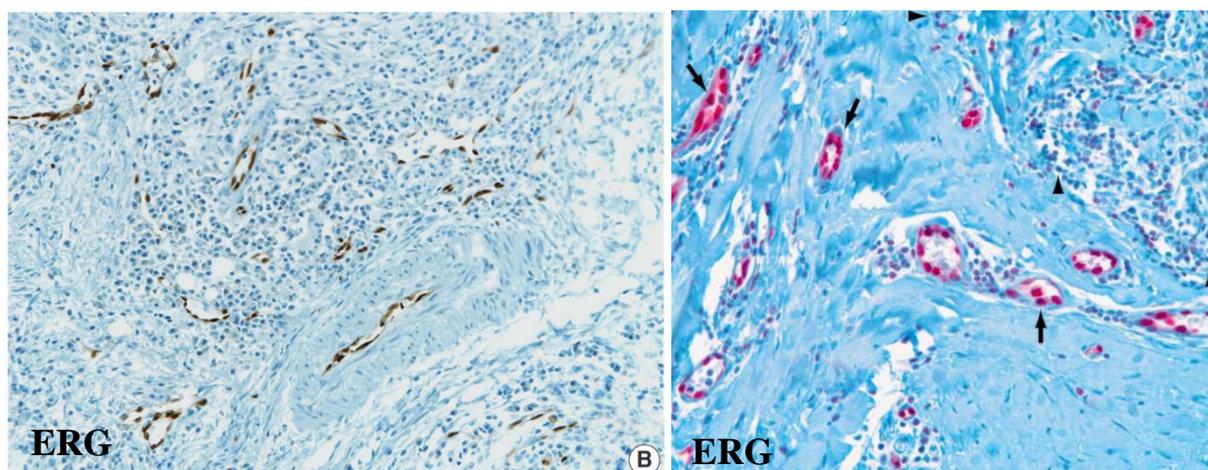
*ERG* est donc une protéine avec de multiples champs d'action, importante dans les systèmes vasculaire et hématopoïétique, mais parfois délétère lors de perturbation de son fonctionnement. Les caractéristiques physio-pathologiques de l'expression de cette protéine permettent de mieux comprendre les résultats des immunomarquages réalisés avec un anticorps anti-*ERG* sur des tissus sains et tumoraux.

## 2. L'utilisation du marqueur *ERG* chez l'Homme

Des études immunohistochimiques ont permis de dresser une cartographie du marquage *ERG* chez l'Homme et de définir les utilisations possibles de ce marqueur dans le diagnostic de certaines tumeurs. (Miettinen *et al.*, 2011, 2013; McKay *et al.*, 2012; Yaskiv *et al.*, 2012; Haber *et al.*, 2015) Deux anticorps monoclonaux ont été utilisés dans ces études, et montrent des résultats globalement cohérents, avec cependant quelques particularités à notifier. Le premier, utilisé par Miettinen *et al.*, est un anticorps monoclonal de souris (Clone 9FY) reconnaissant l'extrémité N-terminale de la protéine, et le second, utilisé dans les autres études, est un anticorps monoclonal de lapin (Clone EPR3864) reconnaissant son extrémité C-terminale.

### a. Cartographie du marquage *ERG* dans les tissus sains

Dans les tissus sains d'humains adultes, le facteur *ERG* est spécifiquement observé dans les noyaux des cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Toutes les autres cellules sont négatives au marquage *ERG*, à l'exception de cellules myéloïdes immatures de la moelle osseuse (Miettinen *et al.*, 2011), et, uniquement avec l'anticorps monoclonal de lapin, des lymphocytes, pour lesquels l'intensité du marquage est uniformément faible (Yaskiv *et al.*, 2012). Le marquage *ERG* de tissus sains est illustré dans la figure 22.

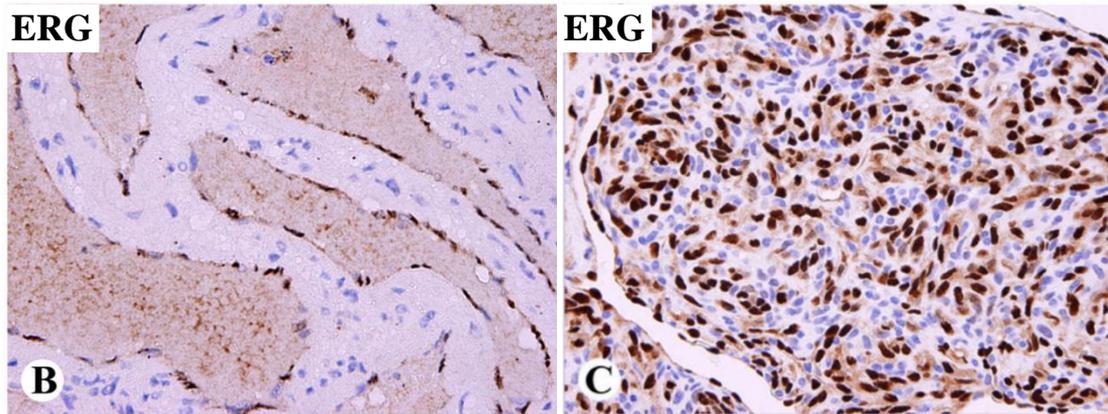


**Figure 22 : Observation microscopique de tissus sains humains après IHC avec un anticorps anti-ERG. Gauche :** L'utilisation de l'anticorps monoclonal 9FY de souris induit un marquage des cellules endothéliales seules. **Droite :** L'utilisation d'un anticorps monoclonal EPR3864 de lapin entraîne, en plus du marquage intense des cellules endothéliales (flèches), un marquage de faible intensité des lymphocytes (extrémités de flèches). À droite, révélation du marquage par un chromogène rouge. Localisation des tissus et grossissements inconnus. (Sources : gauche, Kim *et al.*, 2014 ; droite, Yaskiv *et al.*, 2013 (modifié))

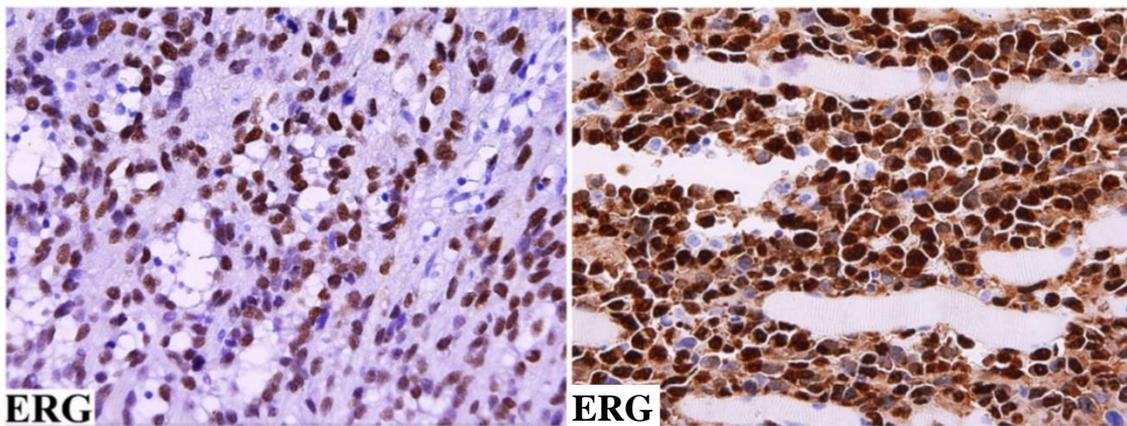
#### b. Immunomarquages ERG dans différents types tumoraux

Concernant les tumeurs endothéliales chez l'Homme, ERG est retrouvé dans toutes les tumeurs bénignes et de malignité intermédiaire, comprenant les hémangiomes, lymphangiomes, hémangioendothéliomes et lymphangioendothéliomes. (Figure 23) Le marquage des angiosarcomes est moins systématique, mais tout de même présent dans la majorité des cas, avec le plus souvent toutes les cellules tumorales marquées. (Figure 24) Cependant, l'absence de marquage d'une proportion variable de cellules est parfois constatée. (Miettinen *et al.*, 2011) Les variants morphologiques de ces tumeurs, notamment les hémangioendothéliomes et hémangiomes épithélioïdes, ou les hémangioendothéliomes pseudomyogéniques, sont également marqués par un anticorps anti-ERG. (Schaefer and Hornick, 2018) Les cellules de la stroma réaction sont, en revanche, constamment négatives. (Figures 23, 24) Pour les tumeurs ayant comme point de départ des composants vasculaires autres que les cellules endothéliales, telles que les hémangiopéricytomes, les cellules tumorales sont ERG-négatives alors que les cellules endothéliales normales présentes sont positives. (Miettinen *et al.*, 2011)

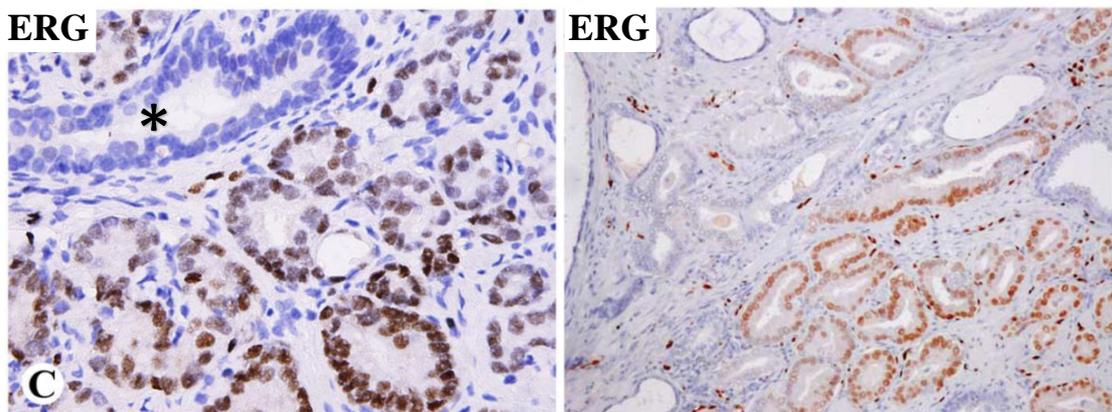
Outre le marquage des cellules endothéliales, ERG est connu chez l'Homme comme marqueur des carcinomes prostatiques. En effet, du fait de la fréquente translocation génique induisant la fusion *ERG:TMPRSS2* au sein de ces tumeurs, celles-ci se montrent positives lors d'immunomarquage avec un anticorps anti-ERG dans environ la moitié des cas. (Miettinen *et al.*, 2011; Minner *et al.*, 2013) Le marquage de ces carcinomes prostatiques peut être homogène ou hétérogène. (Figure 25) Les tumeurs épithéliales non prostatiques ne montrent en revanche une positivité que de façon exceptionnelle. (Miettinen *et al.*, 2011; Yaskiv *et al.*, 2012) Ainsi, un marquage ERG positif constitue un bon indicateur de l'origine prostatique d'un carcinome, notamment lors de tumeur métastatique. Cependant, sa sensibilité moyenne ne permet pas d'écarter cette origine dans le cas d'un marquage négatif. (Minner *et al.*, 2013)



**Figure 23 : Observation microscopique d'un hémangiome caverneux (gauche) et d'un hémangioendothéliome kaposiforme (droite) humains après IHC avec un anticorps anti-ERG.**  
**Gauche :** Les lumières vasculaires sont tapissées par des cellules endothéliales tumorales présentant un marquage nucléaire d'intensité forte. **Droite :** la population endothéliale tumorale est intensément marquée, et accompagnée d'une population péricytaire négative. Localisations et grossissements inconnus. (Source : Miettinen *et al.*, 2011)

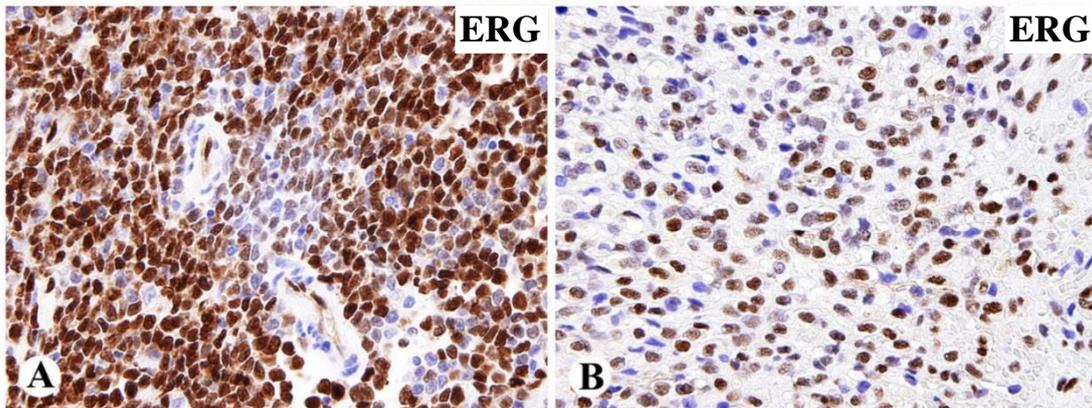


**Figure 24 : Observation microscopique d'angiosarcomes humains après IHC avec un anticorps anti-ERG.** **Gauche :** Angiosarcome péricardique. **Droite :** Angiosarcome solide, peu différencié, localisé dans un muscle squelettique. Les deux tumeurs sont caractérisées par un marquage d'intensité forte des cellules tumorales. Grossissements inconnus. (Source : Miettinen *et al.*, 2011)



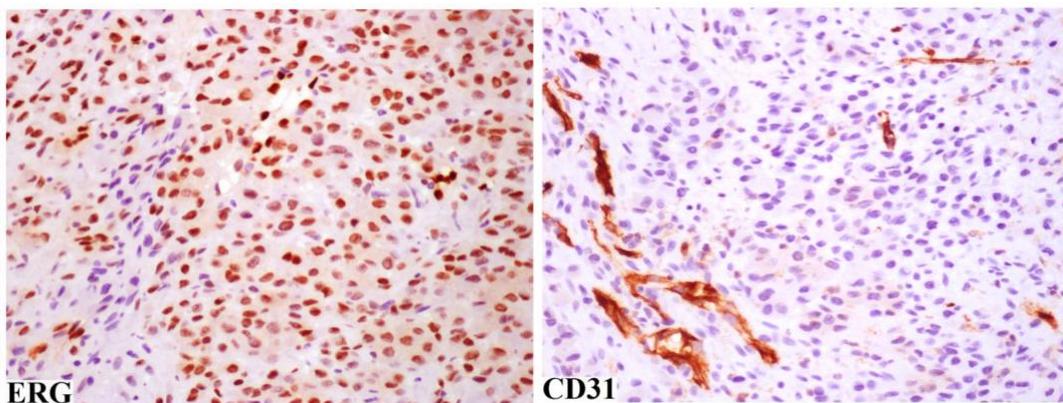
**Figure 25 : Observation microscopique de carcinomes prostatiques humains après IHC avec un anticorps anti-ERG.** Le marquage est d'intensité variable. **Gauche :** Un canal prostatique normal (\*) ne présente pas de marquage. **Droite :** Révélation du marquage par un chromogène rouge. La positivité des cellules carcinomateuses est hétérogène. Grossissements inconnus. (Sources : gauche, Miettinen *et al.*, 2011 (modifié) ; droite, Minner *et al.*, 2013)

Parmi les autres types tumoraux, un marquage ERG positif est parfois observé sur des tumeurs myéloïdes blastiques extramédullaires (leucémies myéloïdes aiguës) (Figure 26), probablement en lien avec, d'une part, les translocations d'*ERG* et sa surexpression intervenant dans la genèse de ces tumeurs, et, d'autre part, l'expression normale d'*ERG* par des précurseurs myéloïdes. (Miettinen *et al.*, 2013) De même, 5 à 10 % des sarcomes d'Ewing sont marqués (Figure 26), un résultat facilement explicable par le rôle des translocations d'*ERG* dans la genèse de 10 % de ces derniers. (Miettinen *et al.*, 2011; Hornick, 2014) ERG est également retrouvé dans certaines tumeurs d'origine chondrocytaire. (Shon *et al.*, 2015)



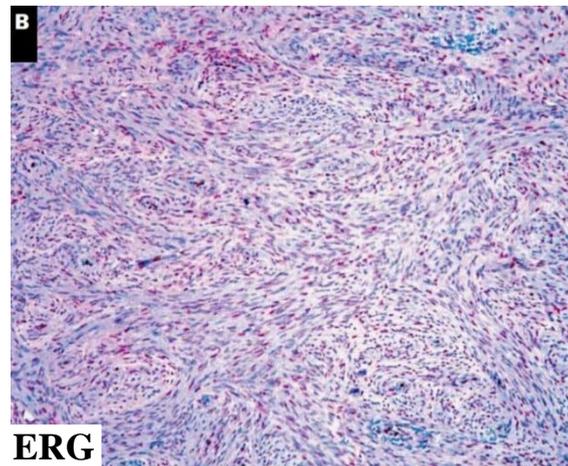
**Figure 26 : Observation microscopique d'une leucémie myéloïde aiguë (gauche) et d'un sarcome d'Ewing (droite) humains après IHC avec un anticorps anti-ERG.** Dans les deux cas, les cellules tumorales sont ERG-positives, avec une intensité variable. Grossissements inconnus. (Source : Miettinen *et al.*, 2011)

L'observation d'un marquage d'une fraction non négligeable (38 à 43 %) de sarcomes épithélioïdes avec l'anticorps de souris, est plus problématique. Ces tumeurs rares, dont l'origine cytogénétique est inconnue, entrent dans le diagnostic différentiel des HSAs. L'association des marqueurs CD31 et ERG apparaît ici bénéfique car la grande majorité de ces sarcomes montre un résultat négatif avec un anticorps anti-CD31. (Figure 27) En revanche, le marquage avec un anticorps anti-CD34 n'est d'aucune aide car positif dans plus de la moitié des cas. (Miettinen *et al.*, 2013) Par ailleurs, ces tumeurs sont le plus souvent négatives lorsque l'on utilise le clone EPR3864 pour l'immunomarquage anti-ERG. (Stockman *et al.*, 2014)



**Figure 27 : Observation microscopique d'un sarcome épithélioïde humain après IHC avec un anticorps anti-ERG (gauche) et anti-CD31 (droite).** Les cellules tumorales sont ERG-positives mais CD31-négatives. Révélation du marquage par un chromogène rouge. Grossissements inconnus. (Source : Miettinen *et al.*, 2013)

Parfois, la positivité de certains types tumoraux n'est pas cohérente entre les études. Cela est probablement lié à une réactivité légèrement différente selon l'anticorps primaire anti-ERG. (Yaskiv *et al.*, 2012) Une proportion non négligeable de méningiomes est positive avec l'anticorps monoclonal de lapin, tandis que ces tumeurs sont systématiquement négatives avec l'anticorps murin. (Figure 28) De même, les deux cas de lymphomes de Yaskiv *et al.* (2012) se sont montrés faiblement positifs, alors qu'aucun des 32 lymphomes de Miettinen *et al.* (2011) ne l'était.



**Figure 28 : Observation microscopique d'un méningiome fibreux humain après IHC avec un anticorps anti-ERG.** Les cellules tumorales sont positives avec une intensité modérée lors de l'utilisation du clone EPR3864. Révélation du marquage par un chromogène rouge. Grossissement inconnu. (Source : Yaskiv *et al.*, 2012)

ERG a été plus particulièrement testé dans deux organes : le système nerveux central et la peau. Pour les tumeurs du système nerveux central, une positivité avec un anticorps anti-ERG est observée dans les cellules endothéliales des vaisseaux accompagnant la tumeur, mais on n'observe pas de positivité dans les cellules tumorales. (Haber *et al.*, 2015) Parmi les tumeurs cutanées, des carcinomes épidermoïdes, léiomyosarcomes, mélanomes, et fibroxanthomes atypiques ont été marqués avec un anticorps anti-ERG. Les cellules tumorales étaient ERG-négatives dans tous les cas. (McKay *et al.*, 2012)

Le tableau VI ci-dessous présente un récapitulatif des résultats des IHC réalisées avec des anticorps anti-ERG dans les deux études de Miettinen *et al.* (2011, 2013) et dans celle de Yaskiv *et al.* (2012).

<b>Tableau VI : Positivité de différents types tumoraux après immunomarquage avec un anticorps anti-ERG chez l'Homme, d'après trois principales études préliminaires</b>		
	<b>Miettinen <i>et al.</i>, 2011, 2013</b> Anticorps monoclonal de souris 9FY	<b>Yaskiv <i>et al.</i>, 2012</b> Anticorps monoclonal de lapin EPR3864
<b>Tumeurs vasculaires</b>		
Bénignes et intermédiaires	149/150	41/41
Angiosarcomes	96/100	50/50
<b>Tumeurs épithéliales</b>		
Carcinomes prostatiques	30/66 (45 %)	68/168 (40 %)
Autres	2/591	1/172
<b>Tumeurs mésenchymateuses</b>		
Sarcomes d'Ewing	2/29	N.R.
Sarcomes épithélioïdes	41/109 (38 %)	N.R.
Méningiomes	0/65	6/15
Autres	Pas d'autres tumeurs positives	0/69
<b>Tumeurs hématopoïétiques</b>		
Leucémies myéloïdes aiguës	7/10	N.R.
Lymphomes	0/32	2/2

*N.R.* : Non recherché

### c. Bilan : utilisation pratique d'ERG dans le diagnostic immunohistochimique des tumeurs vasculaires chez l'Homme

Comme chez le chien, la présentation histologique des angiosarcomes de l'Homme, dont les localisations les plus fréquentes sont la peau, le tissu mammaire et les tissus mous, est variable. Elle peut aller d'un endothélium avec peu d'atypies formant des espaces vasculaires, à un ensemble solide de cellules fusiformes, épithélioïdes, rondes ou anaplasiques sans structures vasculaires identifiables. Le diagnostic différentiel est donc soumis aux mêmes difficultés que dans l'espèce canine et inclut de nombreux processus pathologiques. Par exemple, dans la peau, il comprend d'autres pathologies vasculaires, comme le sarcome de Kaposi ou encore la prolifération vasculaire atypique post-radiation, pour laquelle le diagnostic différentiel avec les HSAs cutanés est le plus délicat. Sont également incluses dans ce diagnostic différentiel des tumeurs non vasculaires, telles que le fibroxanthome atypique, les mélanomes peu différenciés avec un pattern angiomateux, ou encore le léiomyosarcome. Pour les angiosarcomes viscéraux, notamment ceux d'aspect solide, la ressemblance avec un carcinome, un mélanome ou avec un lymphome anaplasique peut être importante. (Machado *et al.*, 2021) Les immunomarquages sont alors fréquemment utilisés, notamment sur des hémangioendothéliomes épithélioïdes et des angiosarcomes peu différenciés, tumeurs de diagnostic complexe occasionnant une confusion possible avec des carcinomes voire des mésothéliomes, ou plus rarement des lymphomes. (Miettinen, 2014)

Comme annoncé précédemment, les marqueurs endothéliaux utilisés chez l'Homme comprennent ERG, CD31, CD34 et d'autres. (Lin and Chen, 2014; Miettinen, 2014; Ranchère and Coindre, 2015; Machado *et al.*, 2021) Quel que soit le marqueur utilisé, la spécificité de la réaction immunologique n'est pas parfaite et d'autres types tumoraux sont parfois marqués. (Machado *et al.*, 2021) Cependant, ERG est un marqueur très sensible des tumeurs vasculaires, bénignes ou malignes, même celles ayant une morphologie inhabituelle, comme les angiosarcomes épithélioïdes ou à cellules fusiformes. (Hornick, 2014) Sa sensibilité est rapportée comme étant meilleure que celles de CD31 et CD34 pour ces tumeurs. (Wang *et al.*, 2014)

En outre, il est doté d'une spécificité intéressante, meilleure que celle de CD34 et équivalente à celle de CD31, mais avec des défauts de spécificité différents, ce qui fait la complémentarité de ces trois marqueurs lorsque qu'on les associe. (Miettinen *et al.*, 2013; Hornick, 2014; Haber *et al.*, 2015) De plus, l'interprétation des marquages faisant appel à un anticorps anti-ERG est plus aisée que ceux avec un anticorps anti-CD31, car le marquage nucléaire est plus franc. De plus, l'expression de CD31 par les plaquettes peut donner lieu à un marquage diffus dans des zones d'hémorragie, compliquant l'observation et l'interprétation du marquage. (Miettinen *et al.*, 2011; Ranchère and Coindre, 2015) Ainsi, ERG est, en anatomopathologie humaine, un marqueur incontournable pour le diagnostic des tumeurs vasculaires, au même titre que CD31.



## IV. Conclusion

Les différents éléments présentés dans cette première partie bibliographique montrent, d'une part, les difficultés auxquelles se heurte le vétérinaire histopathologiste lors du diagnostic d'une tumeur vasculaire splénique chez un chien. En effet, la diversité des formes histologiques, dont certaines montrent peu de caractéristiques spécifiques de cellules endothéliales tumorales, conduit à un diagnostic différentiel relativement large et est parfois à l'origine d'une réelle difficulté lorsqu'il doit se prononcer au vu de la seule coloration standard. D'autre part, les marqueurs d'IHC actuellement validés pour ces tumeurs dans l'espèce canine ne permettent pas toujours une interprétation sans équivoque, bien que CD31 soit plutôt performant.

Ainsi, pouvoir disposer d'un autre marqueur applicable aux tissus canins, avec une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité pour le diagnostic des hémangiomes et des HSAs, serait une aide précieuse pour les pathologistes, et par extension pour les chiens atteints par ces tumeurs. Parmi les cibles possibles, le facteur de transcription ERG semble donc être un très bon candidat. Son utilisation en IHC sur des tissus humains est associée à une très bonne sensibilité et à une spécificité intéressante pour les tumeurs vasculaires. À ce jour, aucune étude préliminaire n'a encore été publiée quant à sa possible utilisation sur des tissus canins.



## **PARTIE 2**

# **ÉTUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE DE LA PROTÉINE ERG COMME MARQUEUR DES TUMEURS VASCULAIRES SPLÉNIQUES CANINES**

### **I. Objectif de la thèse**

Comme vu précédemment, l'hémangiosarcome est un cancer à croissance rapide et hautement invasif, provenant de précurseurs des cellules endothéliales qui tapissent la paroi interne des vaisseaux. Les HSAs canins représentent entre 0,3 % et 2.7 % des tumeurs canines, et plus de la moitié apparaissent dans la rate. En raison de son comportement biologique agressif, cette tumeur est associée à un mauvais pronostic. Il est donc essentiel pour le vétérinaire d'établir le bon diagnostic.

L'histologie, technique permettant de visualiser la morphologie du tissu et des cellules impliquées dans le développement de la tumeur, est le gold standard pour le diagnostic des tumeurs chez le chien, mais elle n'est pas toujours suffisante. L'immunohistochimie (IHC), permettant de visualiser des marqueurs spécifiques sur la cellule, est une technique complémentaire de l'histologie, fréquemment utilisée et facile d'accès en routine. En médecine humaine, les marqueurs endothéliaux CD31 et ERG sont les marqueurs principalement utilisés pour le diagnostic des angiosarcomes. Chez le chien, le marqueur CD31 est fréquemment exploité, mais le marqueur ERG n'a jamais été utilisé, y compris dans cette indication.

L'objectif de cette thèse a été d'évaluer la possibilité et l'intérêt d'utiliser un anticorps anti-ERG, développé pour reconnaître la protéine ERG humaine, pour le diagnostic de tumeurs vasculaires chez le chien, en se concentrant sur celles d'origine splénique.

Afin d'obtenir une première information sur la similarité des protéines ERG humaines et canines, une comparaison des séquences protéiques ERG des deux espèces a été réalisée à l'aide d'un logiciel d'alignement de séquences. L'objectif était de déterminer le pourcentage d'homologie entre les séquences humaine et canine. Une forte homologie serait en faveur d'une possible reconnaissance de la protéine ERG canine par cet anticorps anti-ERG.

Une fois la similarité des protéines ERG humaine et canine démontrée, une étude immunohistochimique a été réalisée. Des immunomarquages avec l'anticorps anti-ERG comme anticorps primaire ont été réalisés sur trois groupes de tumeurs spléniques canines : des tumeurs vasculaires bénignes et malignes, des tumeurs stromales et un troisième groupe comprenant des tumeurs spléniques particulières ou rares, comme des tumeurs hématologiques ou des métastases spléniques de tumeurs primitives extra-spléniques. Ceci a permis d'obtenir une idée de la sensibilité et de la spécificité de l'immunomarquage ERG pour les tumeurs vasculaires du chien.

En complément des marquages avec l'anticorps anti-ERG, des marquages avec un anticorps anti-CD31 ont été réalisés. D'une part, le marquage des tumeurs vasculaires a permis d'apprécier d'éventuelles différences de sensibilité entre ces deux marqueurs. D'autre part, le marquage des autres tumeurs présentant un marquage ERG positif inattendu a servi à confirmer l'hypothèse d'une possible origine vasculaire de ces tumeurs.

## II. Matériel et méthode

### A. Comparaison des protéines ERG humaine et canine par bioinformatique

Les séquences d'acides aminés des isoformes ERG humaines et canines ont été comparées à l'aide du programme Clustal Omega (version 1.2.4).

Les isoformes humaines ont été recherchées dans la base de données UniProt (The UniProt Consortium), puis leurs séquences d'acides aminés ont été alignées. La même opération a été réalisée pour les isoformes canines. Les résultats obtenus ont permis l'identification, pour chaque espèce, de l'isoforme contenant le plus de domaines conservés avec les autres isoformes ERG de la même espèce. Les séquences d'acides aminés de ces deux isoformes ont alors été alignées afin d'obtenir un pourcentage de similitude entre celles-ci.

En complément, la séquence de la région C-terminale, reconnue par l'anticorps utilisé dans les travaux présentés, a été comparée entre les isoformes humaines et canines, afin d'analyser les similitudes de cette séquence entre les deux espèces.

### B. Immunomarquages de tumeurs spléniques canines

#### 1. Sélection des cas inclus dans l'étude

L'utilisation d'échantillons tumoraux provenant de chiens atteints de tumeurs spléniques a fait l'objet d'une demande au comité d'éthique de VetAgro Sup. Un avis favorable a été obtenu sous le numéro de saisine 2181.

Trois catégories de tumeurs spléniques ont été soumises à un marquage ERG :

- ❖ Des tumeurs vasculaires (hémangiomes et HSAs), afin d'observer les capacités de l'anticorps anti-ERG à mettre en évidence les cellules tumorales d'origine endothéliales (notion de sensibilité du marqueur utilisé).
- ❖ Des tumeurs stromales afin de vérifier l'absence de marquage pour des cellules tumorales qui n'ont pas une origine endothéliale (notion de spécificité du marqueur utilisé). Pour rappel, ces tumeurs se présentent le plus souvent sous la forme de faisceaux de cellules fusiformes, pouvant parfois inclure de nombreuses hématies et mimer ainsi une tumeur d'origine vasculaire. (Wittenberns *et al.*, 2021)
- ❖ Des tumeurs particulières ou rares. L'objectif était de vérifier si certaines de ces tumeurs pouvaient présenter une positivité inattendue au marquage avec un anticorps anti-ERG, susceptible d'induire le pathologiste en erreur dans le cadre d'un diagnostic de routine.

Pour tous les échantillons tumoraux, lorsqu'une portion de rate non infiltrée par le processus néoplasique était présente sur le prélèvement, son marquage était également analysé afin de préciser la cartographie des populations cellulaires exprimant cette protéine. De même, lorsqu'une portion d'un autre organe était présente sur la coupe, comme cela a été le cas pour un nœud lymphatique, le marquage était également analysé.

a. Première étape de sélection des cas : recensement dans les archives numériques disponibles, à partir du diagnostic établi, des cas d'intérêt

Les cas d'hémangiomes et d'HSAs ainsi que les tumeurs du troisième groupe d'étude ont été sélectionnés parmi les cas diagnostiqués au laboratoire d'histopathologie du campus vétérinaire de VetAgro Sup entre septembre 2011 et juin 2021. La sélection s'est faite en rentrant dans la base de données du logiciel HML, utilisé par le laboratoire, les mots clés « chien », « rate », « splénique », « hémangiosarcome », « hémangiome », « tumeur ».

**Cette étape a permis la sélection de huit hémangiomes spléniques, 68 hémangiosarcomes spléniques et 20 tumeurs spléniques du troisième groupe (tumeurs particulières ou rares).**

En parallèle, afin d'obtenir les cas de tumeurs spléniques de type stromal, nous avons fait appel aux collections du LAPVSO (Laboratoire d'Anatomie Pathologique Vétérinaire du Sud-Ouest, 31 100 Toulouse) qui a aimablement accepté de nous confier le matériel biologique (blocs en paraffine) correspondant.

**Cette étape a permis la sélection de 141 cas supplémentaires.**

**Au total, 237 cas ont donc été présélectionnés pour cette étude rétrospective.**

b. Seconde étape de sélection des cas : observation des lames colorées en hémalun-éosine et choix du bloc en paraffine à utiliser prioritairement

Une seconde étape de sélection a été effectuée à partir des lames colorées en HE obtenues à partir de chacun des cas présélectionnés. Il faut savoir que dans le cadre du diagnostic des tumeurs spléniques, plusieurs blocs en paraffine sont le plus souvent réalisés pour la même tumeur. L'objectif de cette étape était donc double : d'une part, inclure ou exclure définitivement chaque cas présélectionné dans l'étude et, d'autre part, choisir pour chaque cas retenu le bloc le mieux adapté. Le choix était fondé sur les critères suivants :

- Disponibilité du bloc dans les archives du laboratoire (certains blocs utilisés pour d'autres études sont épuisés ou proches de l'être)
- Taille et qualité du prélèvement suffisantes pour permettre une lecture aisée
- Confirmation du diagnostic établi à la première lecture
- Présence de cellules tumorales en quantité suffisante
- Et, si possible, présence sur la lame d'une portion de rate non infiltrée par le processus néoplasique, afin de disposer de vaisseaux témoins positifs intrinsèques. Ce critère était notamment pris en compte lorsque plusieurs blocs étaient disponibles pour un même cas.

Pour la très grande majorité des cas présélectionnés à partir de la base de données de VetAgro Sup, les lames utilisées pour le diagnostic de la tumeur étaient archivées au laboratoire et donc directement disponibles. Pour les autres cas ainsi que pour l'ensemble des cas fournis par le LAPVSO, la préparation de lames colorées en HE à partir des blocs de paraffine a été nécessaire. Pour cela :

- Des sections de trois micromètres d'épaisseur ont été découpées à l'aide d'un microtome (Microm, HM 340 E) et déposées sur des lames porte-objet StarFrost® (Knittel Glass). Les lames blanches ainsi obtenues ont été séchées dans une étuve une heure à 56°C ou plusieurs heures à 30°C suivant le délai avant la coloration.

- Les lames blanches ont ensuite été réhydratées dans un automate colorateur (Myr, MYREVA SS-30). Le but de cette étape était de retirer la paraffine imprégnant les tissus et de la remplacer par une solution tampon physiologique appelée tampon phosphate salin (PBS : phosphate-buffered saline). La paraffine n'étant pas miscible dans l'eau ou le tampon physiologique, des passages dans différents bains de solvants ont été réalisés selon les étapes suivantes :

- Trois bains de 10 minutes d'Ottix (Microm, T/X0086), un solvant miscible avec la paraffine, qui permet de remplacer toute la paraffine contenue dans les tissus.
- Un bain de deux minutes d'Ottix Shapper (Microm, T/02070079), un solvant contenant 50 % d'Ottix et 50 % d'alcool, remplaçant de la même façon l'Ottix imprégnant les tissus.
- Un bain d'une minute d'alcool (VWR, 20820-362). Miscible avec le Shapper, il remplace à son tour celui-ci dans les tissus.
- Un bain de cinq minutes de PBS (Eurobio, CS3PBS010U), permettant la réhydratation finale des tissus en remplaçant l'alcool.

- Les lames ainsi réhydratées ont été colorées à l'Hémalun-Phloxine (coloration aux propriétés identiques à la coloration HE) par le même automate, par passage dans plusieurs bains :

- Un bain d'hémalun (VWR, 1.09249.2500) de cinq minutes
- Rinçage par plusieurs bains d'eau successifs de quelques secondes, jusqu'à ce que l'eau soit incolore
- Un bain d'HCL (VWR, 4024829) dilué à 1/100 dans de l'eau distillée, de quelques secondes
- Un bain d'eau d'une minute
- Un bain d'eau lithinée (carbonate de Lithium (ThermoFisher Scientific, 013418.36) saturé dans de l'eau distillée) de quelques secondes
- Un bain de phloxine B (Réactifs Ral, 36147-7) de cinq minutes
- Rinçage par plusieurs bains d'eau successifs de quelques secondes, jusqu'à ce que l'eau soit incolore.

- À la fin de la coloration, les lames ont été à nouveau déshydratées progressivement par des bains successifs d'alcool, de Shapper et d'Ottix de mêmes durées que pour la réhydratation.

- Enfin, après un séchage sous hotte, les prélèvements ont été protégés par montage d'une lamelle en verre (VWR, 631-1339) sur chaque lame, à l'aide d'un milieu de montage (Diamount mounting medium, Microm, T/030400). Cette étape a été effectuée par un automate dédié (Thermo Scientific, Microm CTM6).

Finalement **200 cas ont été sélectionnés**. Le nombre final de cas inclus dans chaque catégorie est récapitulé dans le tableau VII.

<b>Tableau VII : Nombre final de cas inclus dans l'étude, par catégories de tumeurs</b>		
<b>Diagnostic initial</b>	<i>Dont (sous-catégories)</i>	<b>Total</b>
Tumeurs vasculaires		65
Hémangiome	5	
HSA	60	
Tumeurs stromales		117
Tumeurs spléniques particulières ou rares		18
Sarcome histiocytaire	3	
Sarcome à cellules dendritiques	2	
Mastocytome	2	
Carcinome	2	
Sarcome des cellules réticulées	1	
Schwannome malin	1	
Lymphangiome	1	
Léiomyosarcome	1	
Lymphome B	1	
Lymphome T	1	
Leucémie aiguë à mégacaryoblastes	1	
Ostéosarcome télangiectasique	1	
Tumeur mixte fusiforme / carcinome anaplasique	1	

## 2. Réalisation des immunomarquages

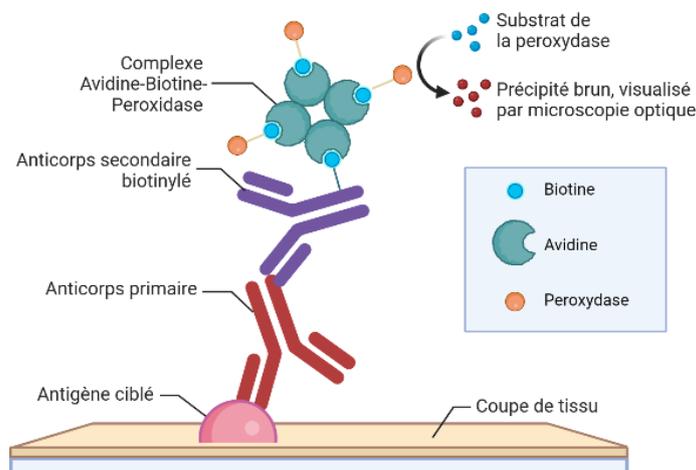
### a. Principe général de l'immunohistochimie et système ABC

Le principe de l'IHC est de visualiser l'expression d'un antigène d'intérêt sur une coupe de tissu. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un anticorps primaire spécifique de l'antigène à mettre en évidence, d'un générateur de signal permettant la visualisation de la liaison de l'anticorps à l'antigène, si ce dernier est présent sur la coupe traitée, et, le plus souvent, d'un dispositif d'amplification du signal. Le système d'amplification/révélation utilisé dans cette thèse est la méthode ABC (Avidin-Biotin Complex).

Le protocole de la méthode ABC fait appel à plusieurs réactifs (Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux, 2000) :

- ❖ Un anticorps primaire ayant la capacité de reconnaître et de se fixer spécifiquement à l'antigène d'intérêt, par reconnaissance d'un épitope correspondant à son paratope.
- ❖ Un anticorps secondaire, dirigé contre les immunoglobulines de l'espèce dans laquelle a été produit l'anticorps primaire, et couplé chimiquement à une molécule de biotine. Les anticorps secondaires reconnaissent les anticorps primaires et se fixent sur ceux-ci. Généralement, plusieurs anticorps secondaires se lient à un anticorps primaire, ce qui permet une première amplification du signal.
- ❖ Un complexe avidine-biotine-peroxydase. L'avidine est une glycoprotéine présente dans le blanc d'œuf, ayant une forte affinité pour la biotine pour laquelle elle possède quatre sites de liaison. Chaque complexe est composé d'une molécule d'avidine et de trois molécules de biotine couplées chacune à une peroxydase. Un complexe se lie à la molécule de biotine d'un anticorps secondaire biotinylé, au niveau du quatrième site de liaison de l'avidine laissé libre. Cette fixation permet également une amplification du signal. (Meuten, 2017)
- ❖ La révélation de ces complexes est ensuite permise par l'ajout d'un substrat de la peroxydase, qui à son contact va former un précipité insoluble de couleur marron. C'est ce précipité qui est observé sur les lames et qui permet finalement d'identifier les cellules exprimant l'antigène d'intérêt.

La figure 29 illustre les interactions entre chaque réactif intervenant dans le système ABC.



**Figure 29 : Représentation schématique des interactions entre chaque réactif intervenant dans le système ABC.** (Source : C. Klein. Créé avec biorender.com.)

#### b. Grandes étapes de l'immunomarquage (ABCAM, 2019; Magaki *et al.*, 2019)

Dans cette thèse, les marquages ont été réalisés sur des sections de trois micromètres d'épaisseur de tumeurs spléniques de chien, fixées dans du formol et incluses en paraffine. Ces sections, déposées sur des lames pour préparations histologiques de type SuperFrost Plus (VWR, 631-9483) ont été séchées dans une étuve à 30°C pendant plusieurs heures avant leur utilisation. Les étapes détaillées ci-après ont ensuite été réalisées.

### Étape 1 : Réhydratation des lames et démasquage des antigènes

Comme pour la coloration HE, la première étape d'un immunomarquage consiste en la réhydratation des tissus, afin de remplacer la paraffine qui les imprègne par de l'eau, pour se rapprocher de leur état physiologique.

La seconde étape du marquage est une étape de démasquage des antigènes. Elle a pour objectif de restaurer la conformation des protéines et autres macromolécules, altérée lors du processus de fixation des prélèvements au formol, afin que les épitopes soient accessibles à l'anticorps primaire lors du marquage.

En pratique, les deux étapes ont été réalisées en une seule incubation, à une température de 95°C dans l'automate Lab Vision™ PT Module (EpreDia, A80400012). (Figure 30). Les lames ont été placées 40 minutes dans une solution tampon. Si l'anticorps nécessitait un démasquage en pH = 9, le tampon Dewax and Hier buffer H (EpreDia, TA-999-DHBH) était utilisé, et s'il nécessitait un démasquage en pH = 6, le Dewax and Hier buffer L (EpreDia, TA-999-DHBL) l'était. Pour un démasquage en pH = 4, la solution de pH 6 était utilisée, avec ajout d'acide chlorhydrique au goutte à goutte et mesure du pH concomitante, jusqu'à atteindre le pH souhaité. Le pH requis pour la solution de démasquage de chacun des anticorps utilisés au cours du projet est consultable dans le tableau VIII.

Pour effectuer les étapes suivantes (2 à 6), les lames ont été transférées dans l'automate Lab Vision™ Autostainer 360 (EpreDia, A80500027). (Figure 30)

### Étape 2 : Blocage de la peroxydase endogène

La peroxydase était l'enzyme utilisée lors du processus de révélation du marquage. Or, cette enzyme est présente de façon endogène dans certains tissus et cellules, ce qui pourrait interférer avec le marquage en donnant un signal faussement positif, non spécifique.

En pratique, après un lavage en PBS, les lames ont été incubées 10 minutes à température ambiante en présence d'eau oxygénée (Eau Oxygénée 10 volumes, LPG) préalablement diluée au 1/3, afin d'inactiver la peroxydase endogène. L'eau oxygénée a ensuite été éliminée des lames par un lavage de 10 minutes en PBS.

### Étape 3 : Blocage des fixations non spécifiques

Les anticorps utilisés lors des immunomarquages présentent des sites de fixation spécifiques. Pour notre anticorps primaire, ceux-ci sont localisés sur l'antigène ERG, et pour les anticorps secondaires ils correspondent à des portions de l'anticorps primaire. Cependant, les anticorps peuvent aussi se fixer sur d'autres sites non spécifiques, répartis dans les constituants du tissu, comme par exemple des récepteurs à la partie Fc (fragment cristallisable) des immunoglobulines. Cette liaison pourrait être à l'origine d'un signal positif non spécifique, contribuant au bruit de fond et empêchant une interprétation correcte des immunomarquages. L'objectif de cette étape était donc de saturer ces sites de fixation non spécifiques avec une solution de blocage contenant notamment de l'albumine sérique de bovin.

En pratique, les lames ont été incubées 30 minutes à température ambiante dans la solution de blocage du kit UltraTek HRP anti-polyvalent dédié aux immunomarquages (Microm, AFN600).

#### Étape 4 : Marquage des prélèvements

Pour l'étape de marquage à proprement parler, les lames ont ensuite été mises au contact de l'anticorps primaire pendant une heure afin de permettre sa fixation aux antigènes d'intérêt. Après un rinçage de 10 minutes dans un bain de PBS, elles ont été incubées 30 minutes en présence de l'anticorps secondaire couplé à la biotine, également fourni dans le kit Microm AFN600. Celui-ci correspond plus précisément à un mélange d'anticorps biotinylés dirigés contre des anticorps de rat, souris et lapin. Les lames ont ensuite été rincées 10 minutes en bain de PBS puis incubées 30 minutes avec le complexe avidine-biotine-peroxydase du kit Microm. Ce complexe se lie à la biotine couplée à l'anticorps secondaire. Toutes les étapes de marquage ont été réalisées à température ambiante.

#### Étape 5 : Révélation du marquage

La peroxydase présente sur le complexe a ensuite été révélée grâce à l'ajout de son substrat contenu dans le kit Novared (Vector, SK-4800), entraînant la formation d'un précipité marron insoluble visible en histologie. Le temps d'incubation était compris entre deux et cinq minutes selon les anticorps. Les lames étaient ensuite rincées rapidement dans un bain d'eau.

#### Étape 6 : Contre-coloration

Cette étape avait pour objectif de colorer les cellules composant le tissu afin de pouvoir observer l'architecture du prélèvement et la localisation tissulaire et cellulaire du marquage.

En pratique, les lames ont été incubées 15 secondes dans un bain d'hémalun, puis rincées à l'eau. Les lames ont ensuite été transférées dans l'automate MYREVA SS-30 (Myr, F-SS30). (Figure 30)

#### Étape 7 : Déshydratation des lames

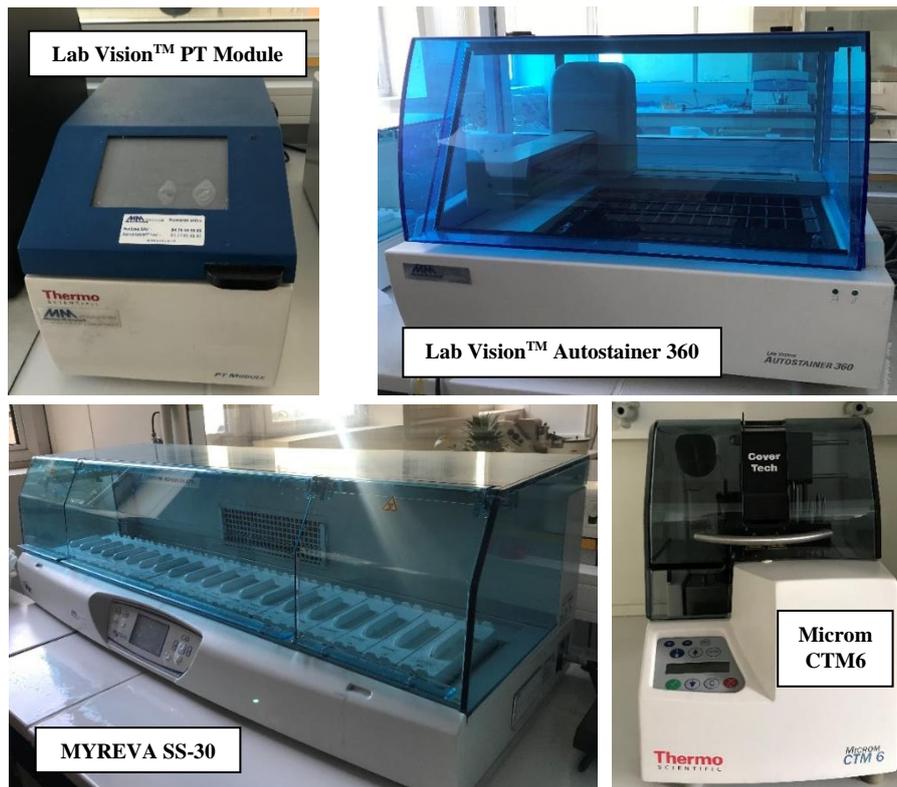
Cette étape a permis la conservation des lames et le montage d'une lamelle.

En pratique, les lames ont été plongées dans des bains successifs de solvants différents de la même façon que les lames colorées en HE : d'abord d'alcool (un bain d'une minute), puis d'Ottix Shapper (un bain de deux minutes), puis d'Ottix (trois bains de 10 minutes) avant d'être séchées à l'air libre.

## Étape 8 : Montage d'une lamelle

La dernière étape, indispensable pour l'observation et la conservation des prélèvements, a été le montage d'une lamelle en verre sur la lame à l'aide d'une colle synthétique (milieu de montage Pertex, Microm, F/00801). Cette étape a été réalisée par l'automate Microm CTM6 (Epredia, 10399229). Tous les automates ayant servi à la réalisation pratique de ce protocole sont visibles sur la figure 30.

Après avoir été séchées 30 minutes à l'étuve à 40°C, les lames peuvent être conservées à l'abri de la lumière à température ambiante pendant plusieurs années.



**Figure 30 : Automates utilisés pour le protocole d'immunohistochimie.**

### **c. Immunomarquages réalisés**

Dans ce travail, tous les cas inclus dans l'étude ont été testés avec l'anticorps anti-ERG. Pour chacun de ces cas, une lame témoin négatif, pour laquelle l'anticorps primaire a été remplacé par du tampon PBS, a également été réalisée. Ce témoin négatif, qui permet de mettre en évidence les marquages non spécifiques ainsi que le bruit de fond, est indispensable pour l'interprétation correcte des marquages.

Chez l'Homme, des marquages avec des anticorps anti-ERG et anti-CD31 sont utilisés en routine pour le diagnostic des tumeurs vasculaires. Nous avons donc choisi pour nos tumeurs spléniques canines de comparer les marquages obtenus avec un anticorps anti-ERG à ceux obtenus avec un anticorps anti-CD31. Pour cela, l'anticorps anti-CD31 sélectionné a été le clone C31.3 + JC/70A, étant donné que celui-ci a déjà été validé dans la littérature scientifique pour cet usage. (Ramos-Vara *et al.*, 2018)

Les cas choisis pour faire l'objet du marquage avec l'anticorps anti-CD31 étaient ceux pour lesquels la comparaison avec le marquage ERG semblait pertinente, c'est-à-dire :

- ❖ Toutes les tumeurs vasculaires, soit cinq hémangiomes et 60 hémangiosarcomes. Seul un cas n'a pas pu être fait car le bloc, probablement rangé dans une autre collection ou utilisé pour une autre étude, n'a pas pu être retrouvé.
- ❖ Quatre tumeurs stromales, dont les cellules tumorales étaient ERG-positives, plus un autre cas ERG-négatif dont le bloc contenait une portion de ganglion lymphatique.
- ❖ Les tumeurs spléniques particulières ou rares pour lesquelles tout ou partie du contingent de cellules tumorales présentait un marquage ERG positif, et celles pour lesquelles les données bibliographiques relatives au marquage CD31 étaient imprécises.

De plus, pour un cas de sarcome histiocytaire et trois cas de tumeurs stromales, la morphologie des cellules et les résultats du marquage ERG ont conduit à réaliser d'autres marquages pour permettre une interprétation plus aboutie.

L'ensemble des marquages utilisés, ainsi que la référence des anticorps primaires utilisés, le pH du tampon de démasquage ainsi que le facteur de dilution appliqué à la solution fournie sont reportés dans le tableau VIII ci-dessous.

<b>Tableau VIII : Anticorps utilisés pour les immunomarquages : Références, pH des tampons de démasquage et facteurs de dilution</b>					
Marquage	Principales cellules marquées	Laboratoire fournisseur	Référence de l'anticorps	pH du tampon de démasquage	Facteur de dilution
ERG (monoclonal de lapin, clone EP111)	Cellules endothéliales (prédictif)	Cell Marque	434R-14	9	1/100
CD31 (monoclonal de souris, clone C31.3 + JC/70A)	Cellules endothéliales	Abcam	Ab199012	9	1/100
IBA1	Macrophages, cellules dendritiques	Abcam	ab178846	9	1/500
CD206	Cellules dendritiques	Novus Biologicals	NBP1-90020	4	1/200
CD3	Lymphocytes T	Dako	N1580	6	1/1
PAX5	Lymphocytes B	Cell Marque	312M-15	6	1/1
Actine	Cellules réticulées	Abcys	CM001C	6	1/50
Anti-kératine AE1/AE3	Cellules épithéliales	Dako	GA053	6	1/50

Les fiches techniques des anticorps anti-ERG et anti-CD31 sont fournies respectivement en annexes 1 et 2.

Pour un cas d'infiltration splénique par un mastocytome sous-cutané, une coloration spéciale au bleu de toluidine a été réalisée. Cette coloration permet une mise en évidence des structures basophiles (notamment les grains cytoplasmiques des mastocytes qui contiennent des glycosaminoglycanes sulfatés) en rouge-violacé, tandis que les autres structures sont colorées en bleu. (Vidal and Mello, 2019) Le protocole de cette coloration est détaillé en annexe 3.

### 3. Méthode de lecture des immunomarquages

#### a. Lecture des lames

J'ai réalisé une première lecture des lames, puis mes observations ont été confirmées lors d'une lecture supplémentaire par le Pr. Thierry Marchal, anatomopathologiste à VetAgro Sup. Les critères utilisés pour la lecture des lames avec immunomarquage étaient les suivants :

- ❖ Validité du marquage : La validité du marquage a été évaluée par l'analyse de deux paramètres. D'une part, l'absence sur la lame témoin négatif de toute positivité des cellules tumorales, et, d'autre part, la présence sur la lame à tester, aussi bien avec l'anticorps anti-ERG qu'avec l'anticorps anti-CD31, d'un marquage des cellules endothéliales tapissant les vaisseaux non néoplasiques présents sur la coupe (témoin positif intrinsèque). Pour les autres marqueurs utilisés, le témoin positif intrinsèque correspondait aux cellules usuellement marquées par chacun d'entre eux ; celles-ci sont répertoriées dans le tableau VIII ci-dessus. L'absence de l'un de ces deux paramètres conduisait à sortir la lame de son groupe lors de l'analyse des résultats. Certains de ces cas ont été analysés à part pour essayer d'expliquer les raisons de cette anomalie.
- ❖ Marquage des cellules tumorales.

La première observation portait sur la présence ou non de cellules tumorales marquées. Si toutes les cellules tumorales observées étaient marquées, le cas était considéré comme positif. Si seulement une partie de la population tumorale observée était marquée, en particulier avec un marquage par plages, le cas était aussi considéré comme positif mais une analyse plus poussée était faite pour en comprendre les raisons. Si moins de 5 % des cellules tumorales étaient marquées, le cas était considéré comme négatif, en accord avec les recommandations usuelles pour ce type de méthode immunologique. (Lin and Chen, 2014) Si aucune cellule tumorale n'était marquée alors que le témoin positif intrinsèque était bien positif, le cas était considéré négatif.

Dans un deuxième temps, une évaluation subjective semi-quantitative de l'intensité du marquage ERG ou CD31 a été réalisée. Pour chaque cas considéré comme positif, un score a été attribué selon l'intensité maximale de marquage observée sur les cellules tumorales présentes sur la lame. Ce score pouvait être faible (+), moyen (++) ou fort (+++). Pour les tumeurs représentées par plusieurs blocs, si le score différait entre les coupes, seul le score le plus élevé était conservé.

Pour ERG, le score « faible » correspondait à l'intensité du marquage observé dans les noyaux des lymphocytes présents sur la lame et la note « forte » à l'intensité du marquage observé dans les noyaux des cellules endothéliales non tumorales présentes sur la lame. La note « moyenne » était attribuée lorsque l'intensité était intermédiaire entre ces deux extrêmes.

Pour CD31, la note « forte » était attribuée lorsque les cellules présentaient un marquage linéaire continu de la bordure cytoplasmique, la note « faible » quand le marquage était focal et la note « moyenne » lorsque le marquage était multifocal.

- ❖ Marquage de cellules non tumorales : pour chaque lame, l'ensemble des populations cellulaires a été observé, en plus des cellules tumorales. Les types cellulaires positifs autres que les cellules tumorales ont été répertoriés.
- ❖ Localisation cellulaire du marquage. Il est normalement nucléaire pour ERG et membranaire pour CD31. Si une localisation intracellulaire différente était observée sur certaines cellules, celle-ci était notée.

#### b. Analyse des résultats

Les résultats de ces marquages ont été consignés pour chaque cas. Les populations de cellules spléniques non tumorales ERG-positives ont été notées et comparées avec les observations rapportées dans les différentes études menées chez l'Homme. Dans un cas de tumeur stromale splénique, un nœud lymphatique d'apparence saine était présent sur le bloc utilisé. Les cellules marquées par ERG et CD31 sur ce ganglion ont également été répertoriées.

Pour les tumeurs d'origine vasculaire, les résultats des marquages ERG et CD31 n'ont pas fait l'objet d'une analyse statistique. Seule la sensibilité  $S$  de chacun des marqueurs a été évaluée, telle que :

$$S = \frac{\text{Nombre de cas de tumeurs vasculaires positifs}}{\text{Nombre total de cas de tumeurs vasculaires avec un marquage valide}}$$

En outre, les impressions subjectives des observateurs, se rapportant notamment à la facilité de lecture, ont été rapportées pour compléter la comparaison des deux marqueurs.

Pour chacun des cas de tumeurs stromales et de tumeurs spléniques particulières ou rares, la démarche était la suivante : Si les cellules tumorales n'étaient pas marquées par l'anticorps anti-ERG, le diagnostic n'était pas remis en question. Si elles l'étaient, des marquages supplémentaires étaient choisis selon le contexte, afin de préciser le diagnostic.



### III. Résultats

#### A. Comparaison des protéines ERG humaine et canine par bioinformatique

La base de données UniProt a permis la récupération des séquences protéiques de six des huit isoformes de la protéine ERG de l'Homme. Chez le chien, sept séquences d'isoformes d'ERG étaient disponibles dans cette même base de données. L'existence des protéines canines n'a pas été démontrée expérimentalement mais elle est « prédite » du fait de la ressemblance de leurs séquences avec les protéines humaines connues. Les isoformes de la protéine ERG utilisées dans les deux espèces considérées sont présentées dans le tableau IX.

Au vu de l'absence de nom défini pour les isoformes canines, toutes les isoformes sont nommées ci-après selon leur numéro d'accèsion Uniprot.

<b>Tableau IX : Isoformes de la protéine ERG chez l'Homme et le chien</b>		
Espèce	Numéro d'accèsion Uniprot	Longueur (acides aminés)
<i>Homo sapiens</i>	P11308-6	325
	P11308-1	462
	P11308-2	363
	P11308-5	317
	P11308-4	479
	P11308-3	486
<i>Canis lupus familiaris</i>	A0A8I3Q0M2	459
	A0A8I3S701	435
	A0A8I3PZU9	463
	A0A8I3PZR0	479
	A0A8I3S712	503
	A0A8I3SC08	462
	A0A8I3Q0I1	455

Pour rappel, il existe chez l'Homme huit isoformes ERG principales, dont la taille varie entre 317 et 486 acides aminés. L'isoforme 4 de 479 acides aminés est considéré comme la forme de référence. (Shah *et al.*, 2016) Chez le chien, la recherche effectuée a montré sept séquences d'isoformes dont la taille varie de 435 à 503 acides aminés.



Le clone EP111, anticorps anti-ERG utilisé pour les immunomarquages de cette thèse, reconnaît l'extrémité C-terminale de la protéine ERG, mais la séquence du peptide utilisé pour la fabrication de l'anticorps n'est pas partagée par le fournisseur. Toutefois, le clone EPR3864, un autre anticorps anti-ERG ayant aussi pour épitope l'extrémité C-terminale de la protéine ERG humaine, est rapporté reconnaître la région des acides aminés 393 et 479. (Park *et al.*, 2010) Cette région était présente sur quatre des isoformes humaines étudiées et sur les sept isoformes canines. La comparaison des séquences humaines et canines dans cette région, visible sur la figure 32, a montré une différence d'un seul acide aminé sur les 87 analysés : la thréonine 468 substituée par une alanine.

```

|CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

sp|P11308-4|ERG_HUMAN          HGIAQALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMN FVAPHPPALPVTSSSFFAAPNPY      60
sp|P11308-3|ERG_HUMAN          HGIAQALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMN FVAPHPPALPVTSSSFFAAPNPY      60
sp|P11308-1|ERG_HUMAN          HGIAQALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMN FVAPHPPALPVTSSSFFAAPNPY      60
sp|P11308-2|ERG_HUMAN          HGIAQALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMN FVAPHPPALPVTSSSFFAAPNPY      60
tr|A0A8I3PZU9|A0A8I3PZU9_CANLF HGIAQALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMN FVAPHPPALPVTSSSFFAAPNPY      60
tr|A0A8I3S701|A0A8I3S701_CANLF HGIAQALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMN FVAPHPPALPVTSSSFFAAPNPY      60
tr|A0A8I3S712|A0A8I3S712_CANLF HGIAQALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMN FVAPHPPALPVTSSSFFAAPNPY      60
tr|A0A8I3SC08|A0A8I3SC08_CANLF HGIAQALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMN FVAPHPPALPVTSSSFFAAPNPY      60
tr|A0A8I3Q0M2|A0A8I3Q0M2_CANLF HGIAQALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMN FVAPHPPALPVTSSSFFAAPNPY      60
tr|A0A8I3Q0I1|A0A8I3Q0I1_CANLF HGIAQALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMN FVAPHPPALPVTSSSFFAAPNPY      60
tr|A0A8I3PZR0|A0A8I3PZR0_CANLF HGIAQALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMN FVAPHPPALPVTSSSFFAAPNPY      60
*****

sp|P11308-4|ERG_HUMAN          WNSPTGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYT      87
sp|P11308-3|ERG_HUMAN          WNSPTGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYT      87
sp|P11308-1|ERG_HUMAN          WNSPTGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYT      87
sp|P11308-2|ERG_HUMAN          WNSPTGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYT      87
tr|A0A8I3PZU9|A0A8I3PZU9_CANLF WNSPTGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYT      87
tr|A0A8I3S701|A0A8I3S701_CANLF WNSPTGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYT      87
tr|A0A8I3S712|A0A8I3S712_CANLF WNSPTGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYT      87
tr|A0A8I3SC08|A0A8I3SC08_CANLF WNSPTGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYT      87
tr|A0A8I3Q0M2|A0A8I3Q0M2_CANLF WNSPTGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYT      87
tr|A0A8I3Q0I1|A0A8I3Q0I1_CANLF WNSPTGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYT      87
tr|A0A8I3PZR0|A0A8I3PZR0_CANLF WNSPTGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYT      87
*****

```

**Figure 32 : Alignement des séquences d'acides aminés des isoformes de la protéine ERG des espèces humaine et canine, dans la région C-terminale reconnue par l'anticorps anti-ERG.** Seules quatre isoformes humaines présentent la région en question, tandis que toutes les isoformes canines la contiennent. Les 86 acides aminés C-terminaux de chaque isoforme la contenant ont été alignés. L'unique acide aminé différenciant chez les deux espèces est encadré en rouge.

## B. Étude immunohistochimique de tumeurs spléniques canines

Les résultats individuels des immunomarquages ERG et CD31 dans chaque groupe de tumeurs sont consultables en annexes 6, 7 et 8.

### 1. Populations cellulaires normales marquées

La présence de portions de rate non infiltrées sur une majorité des coupes examinées a permis le recensement des populations cellulaires spléniques régulièrement ERG-positives, et une comparaison de ces résultats à ceux obtenus avec un anticorps anti-CD31.

#### a. Immunomarquage avec un anticorps anti-ERG

Pour tous les types de structures vasculaires normales de la rate, les cellules endothéliales saines qui les tapissent ont présenté une positivité systématique, avec une intensité de marquage forte. (Figures 33, 34, 36)

Concernant les autres lignées cellulaires, les lymphocytes étaient généralement positifs, mais avec une intensité de marquage faible voire moyenne. (Figure 33, 37) Au sein de la lignée myéloïde, les mégacaryocytes étaient également moyennement positifs (Figure 34), et les polynucléaires neutrophiles moyennement à fortement positifs (Figure 35), mais de façon non systématique. Des cellules identifiées comme myéloïdes immatures étaient également fortement marquées. Les macrophages et cellules dendritiques, d'autres cellules myéloïdes, n'étaient en revanche pas marqués. Aucun autre type cellulaire n'a été observé positif sur l'ensemble des lames de rate observées.

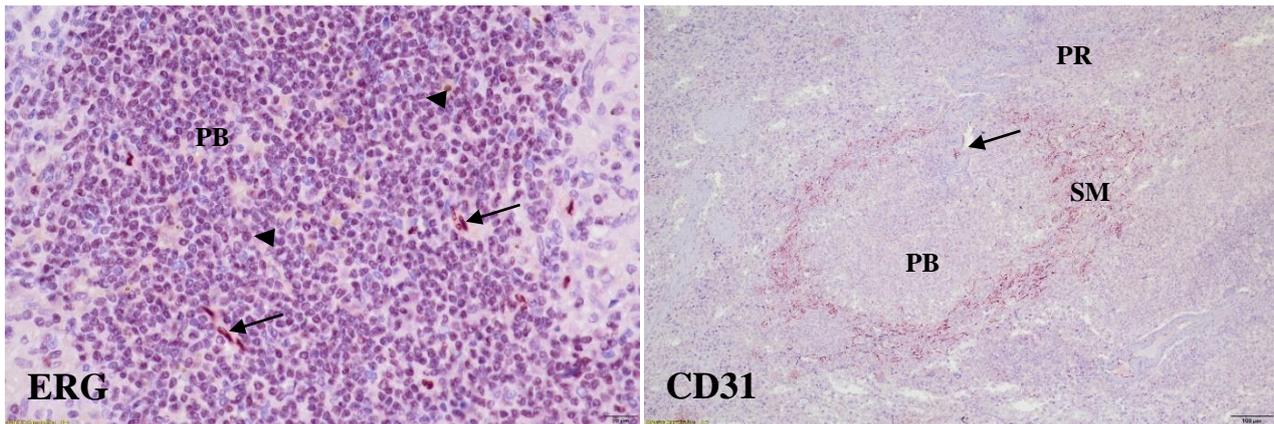
#### b. Comparaison avec CD31

Pour la plupart des structures vasculaires normales de la rate, les cellules endothéliales saines qui les tapissent présentaient une positivité systématique avec une intensité de marquage forte. (Figures 33, 34) Cependant, pour un certain type de vaisseaux sanguins, l'absence de marquage des cellules endothéliales avec l'anticorps anti-CD31 a été observée. Ces vaisseaux présentaient toujours la même architecture en coupe transversale : lumière circulaire régulière contenant des cellules sanguines, tapissée par des cellules endothéliales très nombreuses, de petite taille, au noyau circulaire faisant protrusion dans la lumière. Une image représentative de ces vaisseaux est visible sur la figure 36. Il est à noter que les cellules endothéliales de ce type vasculaire étaient en revanche systématiquement ERG-positives.

Les autres types cellulaires présents dans la rate ne montraient pas de positivité. Dans un seul cas, un marquage cytoplasmique d'une partie des mégacaryocytes, présents sur la lame a été observée. (Figure 34) En outre, avec l'anticorps anti-CD31, un signal positif en bande étroite collée à l'endothélium était fréquemment observé. Il a été supposé que celui-ci correspondait à un marquage des thrombocytes circulants.

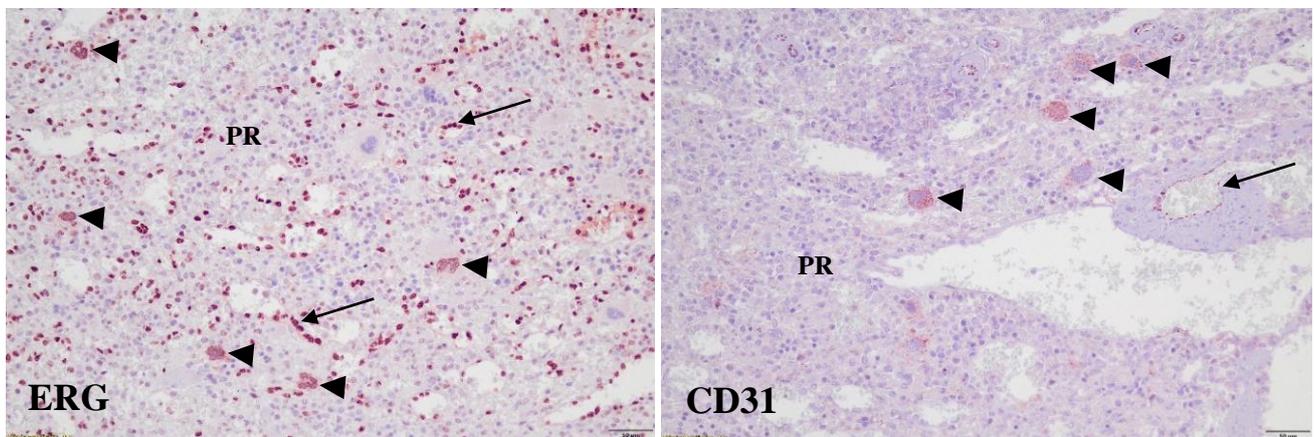
Le marquage du nœud lymphatique présent dans l'un des blocs étudiés a montré une positivité des cellules endothéliales des sinus lymphatiques avec les anticorps anti-ERG et anti-CD31. (Figure 37)

À la différence du marquage obtenu avec l'anticorps anti-ERG, complètement absent des zones de nécrose et des plages hémorragiques, une positivité des cellules endothéliales était présente dans ces zones avec l'anticorps anti-CD31.



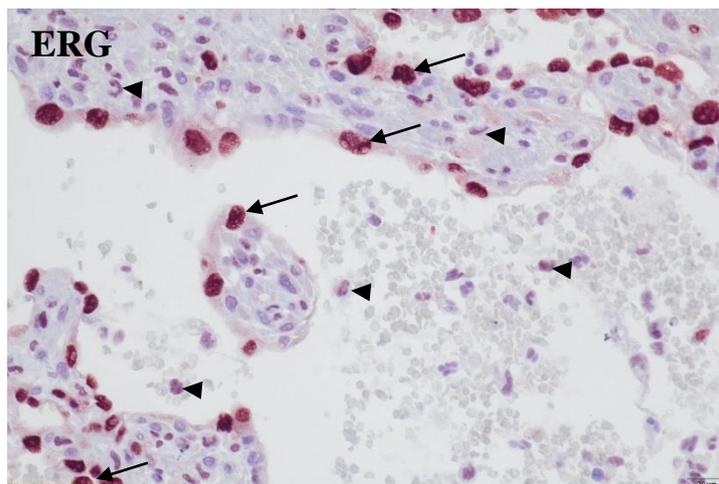
**Figure 33 : Observation microscopique de portions de pulpe blanche de rates saines après IHC avec un anticorps anti-ERG (gauche) et anti-CD31 (droite).** Les lymphocytes (extrémités de flèches) peuplant la pulpe blanche (PB) présentent un marquage ERG d'intensité faible à moyenne, et une absence de marquage CD31.

Les cellules endothéliales des vaisseaux traversant la pulpe blanche (flèches) sont ERG et CD31-positives. De même, les sinus marginaux (SM), vaisseaux entourant le follicule lymphoïde, sont fortement marqués par CD31, et par ERG (non visible sur l'image). Obj. x40 (gauche) ; x10 (droite). (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

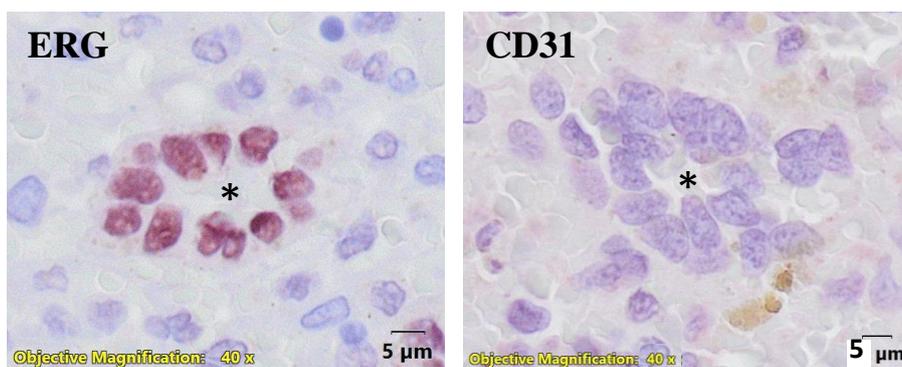


**Figure 34 : Observation microscopique de portions de rates saines après IHC avec un anticorps anti-ERG (gauche) et anti-CD31 (droite), montrant des mégacaryocytes marqués.** Les mégacaryocytes marqués (extrémités de flèches) sont repérables par leurs noyaux multiples formant un amas de grande taille. Dans la pulpe rouge (PR), l'intensité du marquage des vaisseaux (flèches) est ici plus intense avec ERG qu'avec CD31.

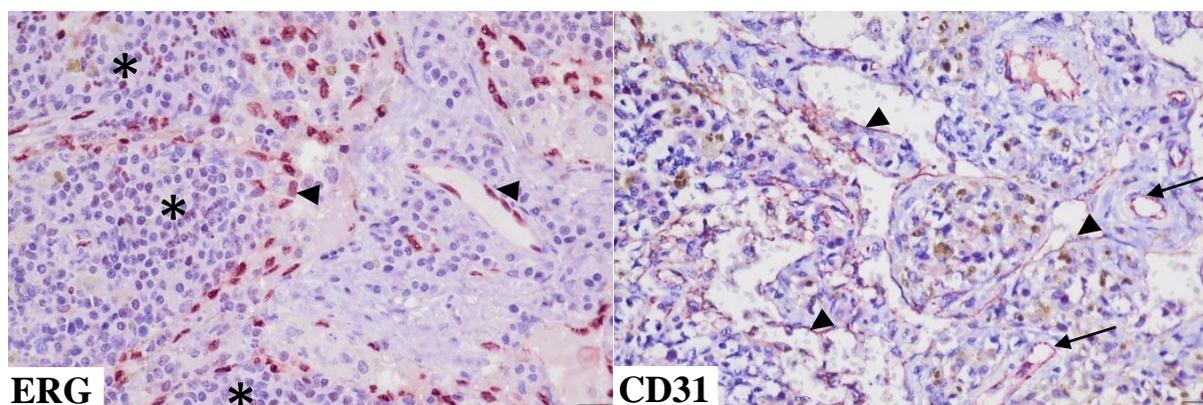
Obj. x20. (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)



**Figure 35 : Observation microscopique d'un HSA après IHC avec un anticorps anti-ERG, montrant des polynucléaires neutrophiles marqués.** Les polynucléaires neutrophiles circulants et tissulaires (extrémités de flèches) sont marqués par ERG avec une intensité moyenne. Les cellules endothéliales (flèches) sont marquées avec une intensité forte. Obj x40. (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)



**Figure 36 : Observation microscopique de portions de rates saines après IHC avec un anticorps anti-ERG (gauche) et anti-CD31 (droite), montrant un type vasculaire dont les cellules endothéliales sont positives pour ERG mais négatives pour CD31.** La lumière de ces vaisseaux est repérée par une astérisque (\*). Obj. x100. (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)



**Figure 37 : Observation microscopique de portions d'un nœud lymphatique après IHC avec un anticorps anti-ERG (gauche) et anti-CD31 (droite).** Les cellules endothéliales lymphatiques (extrémités de flèches) sont marquées avec une intensité forte dans les deux cas, de même que les cellules endothéliales des artérioles à droite (flèches). En outre, les lymphocytes des follicules lymphoïdes (\*) apparaissent faiblement positifs avec l'anticorps anti-ERG. Obj. x40. (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

## 2. Tumeurs vasculaires

Le tableau X ci-dessous recense les résultats des marquages ERG et CD31 observés sur les cellules tumorales des hémangiomes et hémangiosarcomes spléniques.

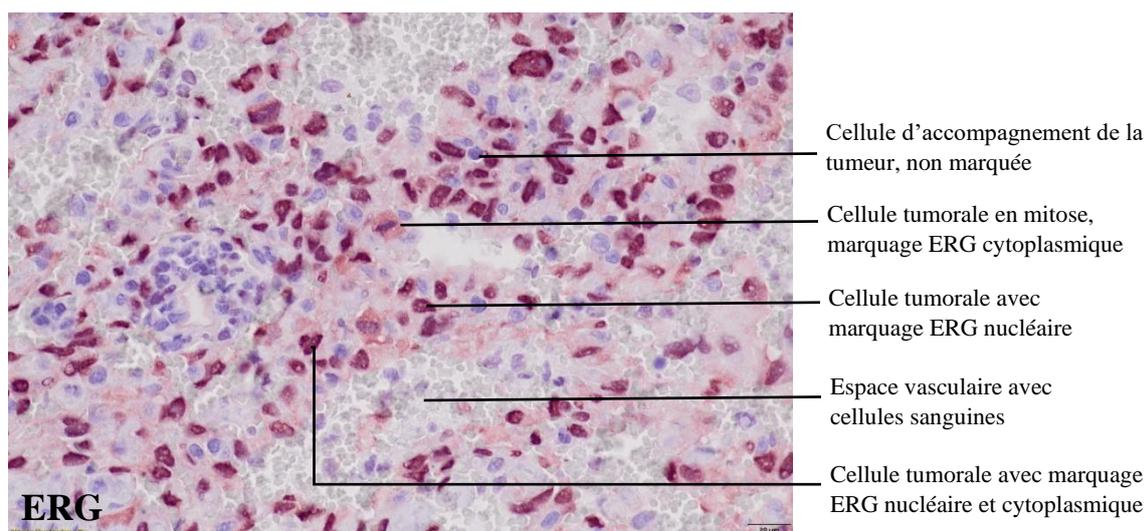
Tableau X : Résultats des marquages ERG et CD31 des tumeurs vasculaires											
Type tumoral	Marquage ERG des cellules tumorales					Marquage CD31 des cellules tumorales					Total
	Abs T+	0	+	++	+++	Abs T+	0	+	++	+++	
Hémangiome	0/5	0/5	1/5	1/5	3/5	0/5	2/5	0/5	1/5	2/5	5
HSA	0/60	0/60	1/60	6/60	53/60	3/59	4/59	8/59	8/59	36/59	60

Légende : HSA : hémangiosarcome ; Abs T+ : Absence de marquage du témoin positif

### a. Immunomarquage avec un anticorps anti-ERG

La totalité des tumeurs vasculaires spléniques observées montrait un marquage ERG des cellules tumorales. La **sensibilité S du marquage ERG pour ces tumeurs était donc de 100 %**. L'intensité du marquage était la plupart du temps forte, dans 86 % des cas (56/65). Elle était moyenne pour 11 % des cas (7/65) et faible pour deux cas (3 %). Au sein des tumeurs, des cellules d'accompagnement non marquées étaient systématiquement observées en quantité variable.

Le marquage était presque systématiquement nucléaire. Cependant, un marquage cytoplasmique a été observé occasionnellement sur des cellules tumorales en mitose, alors même que le marquage nucléaire disparaissait. Ceci a notamment été observé sur le cas HIS20-1153, dont une image est montrée sur la figure 38. En outre, sur des cellules saines ou tumorales, un marquage cytoplasmique concomitant au marquage nucléaire était parfois présent.



**Figure 38 : Observation microscopique d'un HSA splénique canin après IHC avec un anticorps anti-ERG.** L'image montre un marquage strictement cytoplasmique des cellules tumorales en mitose, ainsi qu'un marquage nucléaire fort et parfois cytoplasmique discret des autres cellules tumorales. Obj x30.

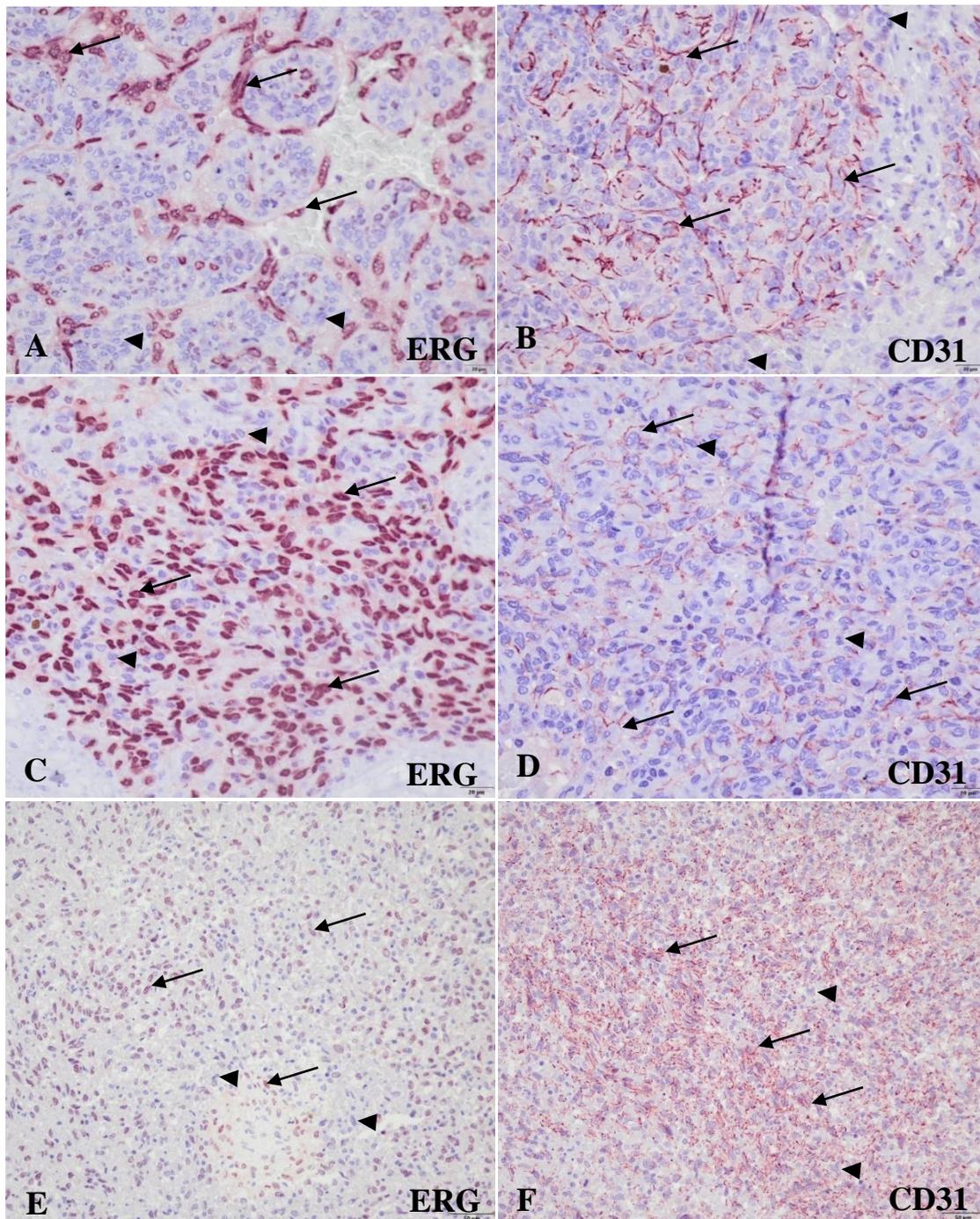
(Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

## b. Comparaison avec CD31

Sur les 65 tumeurs vasculaires spléniques étudiées, seules 64 ont fait l'objet d'un immunomarquage avec l'anticorps anti-CD31. Le marquage CD31 de ces tumeurs n'a pas été interprétable pour trois des HSA, pour lesquels aucune cellule positive n'était observée sur la lame, y compris les cellules endothéliales des vaisseaux sains. Sur les 61 cas restants, le marquage des cellules tumorales était négatif pour 10 % des tumeurs (6/61). **La sensibilité S du marquage CD31 pour ces tumeurs était donc de 90 %.** Par ailleurs, 62 % (38/61) des tumeurs étaient fortement marquées. Le marquage était d'intensité moyenne ou faible pour respectivement 13 % (8/61) et 14 % (9/61) des cas. Au sein des tumeurs, des cellules d'accompagnement non marquées étaient toujours observées. Cependant, certaines de ces cellules, de morphologie fusiforme, semblaient, en comparant les lames des deux marquages, être ERG-positives.

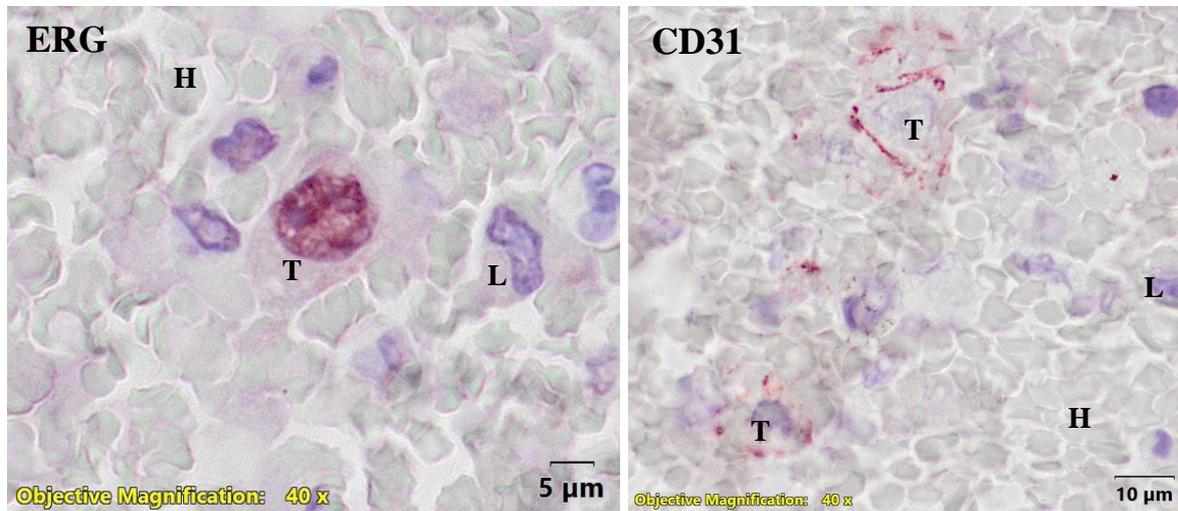
Les cellules marquées avec l'anticorps anti-CD31 présentaient un marquage strictement membranaire, mais d'apparence variable. Parfois, il était continu et occupait la totalité du pourtour de la cellule. Dans d'autres cas, il apparaissait focal. Des situations intermédiaires étaient également régulièrement observées. Ces différents motifs pouvaient coexister au sein d'une tumeur.

Les marquages ERG et CD31 étaient globalement concordants. Cependant, le marquage avec l'anticorps anti-ERG montrait une meilleure sensibilité (six tumeurs CD31-négatives, aucune tumeur ERG-négative) et une intensité du marquage souvent plus forte qu'avec l'anticorps anti-CD31. Dans les deux cas où l'intensité du marquage ERG était faible, le marquage CD31, lui, était fort. La figure 39 présente trois cas d'HSAs illustrant la diversité des marquages ERG et CD31 observés.



**Figure 39 : Observation microscopique de trois HSAs spléniques canins après IHC avec un anticorps anti-ERG (gauche) et anti-CD31 (droite), montrant un marquage des cellules tumorales avec une intensité variable.** Les images côte-à-côte correspondent au même cas. Les cellules tumorales, marquées (flèches), sont accompagnées d'une population de cellules d'accompagnement non marquées en proportion variable (extrémités de flèches). Cas 1 (A, B) : Le marquage des cellules tumorales est d'intensité forte dans les deux cas. Obj. x40 ; Cas 2 (C, D) : Le marquage des cellules tumorales est d'intensité forte pour ERG mais faible pour CD31. Obj. x40 ; Cas 3 (E, F) : Le marquage des cellules tumorales est d'intensité faible pour ERG mais forte pour CD31. Obj. x20. (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

Dans un cas (HIS19-0896), le marquage ERG a permis de souligner la présence de cellules tumorales circulantes marquées dans les espaces vasculaires. Celles-ci étaient également visibles avec le marquage CD31, comme le montre la figure 40.



**Figure 40 : Observation microscopique de cellules tumorales d’HSA circulantes dans les espaces vasculaires spléniques, après IHC avec un anticorps anti-ERG (gauche) et anti-CD31 (droite).** Parmi les hématies (H) et leucocytes (L) non marqués, des cellules endothéliales tumorales (T) circulent. Obj. x100. (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

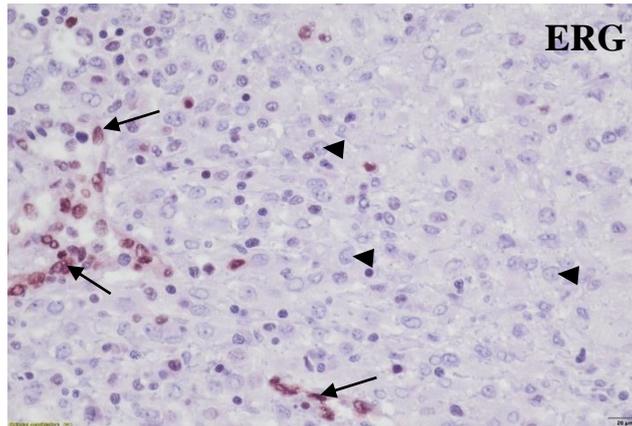
### 3. Tumeurs stromales

Le tableau XI récapitule les résultats des marquages avec les anticorps anti-ERG et anti-CD31 obtenus sur le groupe des tumeurs stromales. Les résultats remarquables et/ou inattendus sont en gras.

<b>Tableau XI : Résultats des marquages ERG et CD31 des tumeurs stromales</b>											
<b>Diag. ini.</b>	<b>Marquage ERG des cellules tumorales</b>					<b>Marquage CD31 des cellules tumorales (sur les quatre cas ERG-positifs)</b>					<b>Total</b>
	<i>Abs T+</i>	<i>0</i>	<i>+</i>	<i>++</i>	<i>+++</i>	<i>Abs T+</i>	<i>0</i>	<i>+</i>	<i>++</i>	<i>+++</i>	
Tumeur stromale splénique	1/117	112 /117	0/117	<b>1/117 (Recat.)</b>	<b>3/117 (1 Recat.)</b>	0/4	2/4	0/4	<b>1/4 (Recat.)</b>	<b>1/4 (Recat.)</b>	117

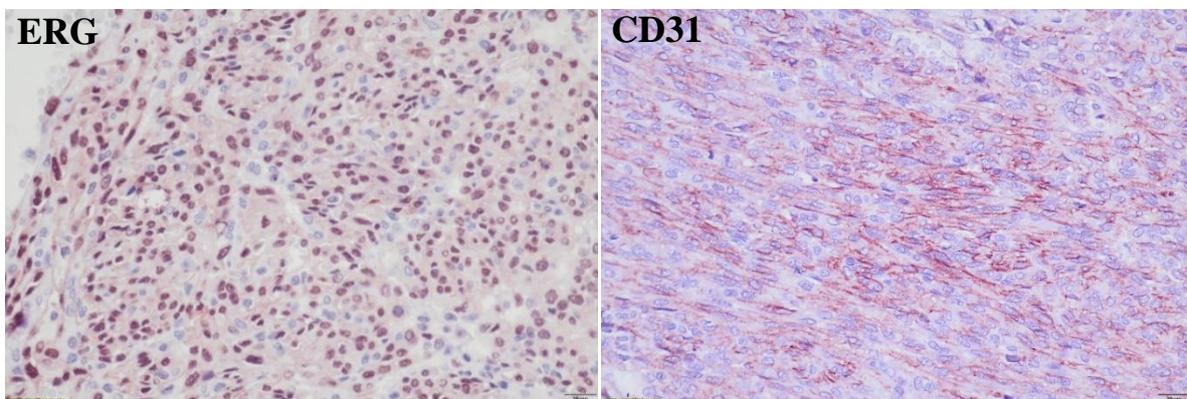
*Légende : Diag. ini. : Diagnostic initial ; Abs T+ : Absence de marquage du témoin positif ou marquage anormal ; Les résultats remarquables sont mis en gras ; La mention « (Recat.) » indique les cas ayant fait l’objet d’une recatégorisation.*

Sur les 116 cas de tumeurs stromales spléniques pour lesquels le témoin positif autorisait l’interprétation du marquage, 97 % présentaient des cellules tumorales négatives au marquage avec l’anticorps anti-ERG. Une image représentative de ces tumeurs est présentée sur la figure 41. Cependant, quatre cas se sont révélés marqués, avec une intensité moyenne (un cas) ou forte (trois cas).



**Figure 41 : Observation microscopique d'une tumeur stromale splénique après IHC avec un anticorps anti-ERG.** Contrairement aux cellules endothéliales (flèches) fortement marquées, les cellules tumorales (extrémités de flèche) sont négatives. Obj. x40. (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

Pour deux des quatre cas positifs avec l'anticorps anti-ERG, le marquage obtenu avec l'anticorps anti-CD31 était également positif, d'intensité moyenne ou forte. Ces deux cas ont été recatégorisés en HSAs. L'un d'eux montrait des cellules tumorales d'apparence compatible avec un HSA peu différencié, visibles sur la figure 42, mais l'autre montrait des cellules à cytoplasme important, microvacuolisé, à bords anguleux. Pour ce deuxième cas, des marquages supplémentaires AE1-AE3, CD3, PAX5, Actine et IBA1 n'ont pas induit de positivité des cellules tumorales, appuyant le diagnostic de tumeur endothéliale.



**Figure 42 : Observation microscopique d'une tumeur stromale splénique recatégorisée HSA, après IHC avec un anticorps anti- ERG (gauche) et anti-CD31 (droite).** Les cellules tumorales sont fusiformes et ERG-positives d'intensité moyenne. Le marquage CD31 d'intensité moyenne à forte confirme leur origine endothéliale. Obj. x40. (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

Enfin, la nature précise des deux autres cas de sarcomes stromaux ERG-positifs reste incertaine. Le premier présentait des cellules plutôt rondes, dont la morphologie était peu évocatrice d'un type cellulaire particulier. Les cellules tumorales étaient négatives pour CD31, CD3 et PAX5, suggérant qu'elles n'étaient pas de nature endothéliale, ni lymphoïde. Le deuxième cas présentait des cellules tumorales de morphologie compatible avec une tumeur à cellules rondes. Celles-ci étaient négatives aux marquages CD31 et CD3, et présentaient un marquage PAX5 douteux. Ce dernier n'était pas clairement positif, avec un marquage plutôt cytoplasmique des cellules, alors que PAX5 est un marqueur de distribution nucléaire.

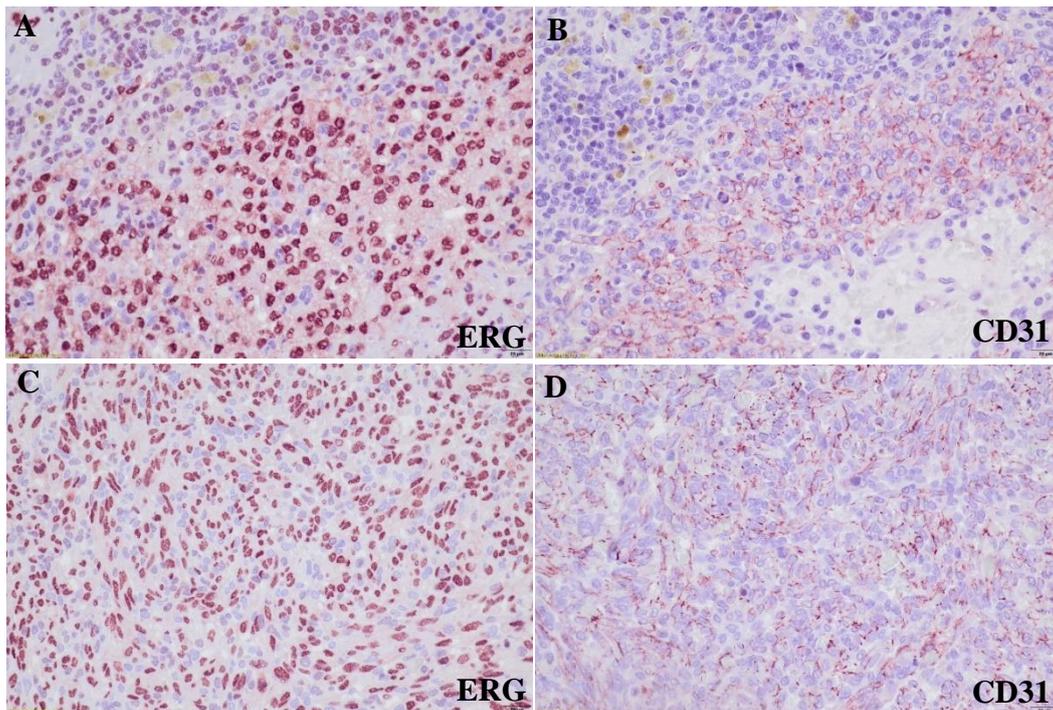
#### 4. Tumeurs spléniques particulières ou rares

Le tableau XII récapitule les résultats des marquages avec les anticorps anti-ERG et anti-CD31 des tumeurs spléniques particulières ou rares. Les résultats remarquables et/ou inattendus sont en gras.

Tableau XII : Résultats des marquages ERG et CD31 des tumeurs spléniques particulières ou rares											
Diagnostic initial	Marquage ERG des cellules tumorales					Marquage CD31 des cellules tumorales					Total
	<i>Abs T+</i>	0	+	++	+++	<i>Abs T+</i>	0	+	++	+++	
Sarcome histiocytaire	1/3	1/3	0/3	0/3	<b>1/3 (Recat.)</b>	0/3	2/3	0/3	0/3	<b>1/3 (Recat.)</b>	3
Sarcome à cellules dendritiques	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	2
Mastocytome	0/2	0/2	0/2	<b>2/2</b>	0/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2	2
Carcinome	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2
Sarcome à cellules réticulées	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1
Schwannome malin	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	1
Lymphangiome	0/1	0/1	0/1	0/1	<b>1/1</b>	0/1	<b>1/1</b>	0/1	0/1	0/1	1
Léiomyosarcome	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	1
Lymphome B	0/1	0/1	<b>1/1</b>	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1
Lymphome T	0/1	0/1	<b>1/1</b>	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1
Leucémie aiguë à mégacaryoblastes	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1
Ostéosarcome télangiectasique	0/1	0/1	0/1	0/1	<b>1/1 (Recat.)</b>	0/1	0/1	0/1	0/1	<b>1/1 (Recat.)</b>	1
Tumeur mixte fusiforme / carcinome anaplasique	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	1

Légende : N.R. : Non réalisé ; Abs T+ : Absence de marquage du témoin positif ou marquage anormal ; Les résultats remarquables sont mis en gras ; La mention « (Recat.) » indique les cas ayant fait l'objet d'une recatégorisation.

Certains de ces résultats inattendus ont entraîné une recatégorisation des tumeurs, avec parfois l'appui de marquages supplémentaires. Le cas de sarcome histiocytaire ERG-positif a finalement été classé HSA. Pour ce cas, les cellules tumorales étaient négatives avec les marquages supplémentaires réalisés : IBA1, CD206, CD3 et PAX5, indiquant qu'elles n'étaient ni des macrophages, ni des cellules dendritiques, ni des lymphocytes. Elles étaient cependant fortement ERG et CD31-positives, comme le montre la figure 43 (A,B). Le cas préalablement diagnostiqué comme un ostéosarcome télangiectasique, également présenté sur la figure 43 (C,D), a lui aussi été recatégorisé HSA, les cellules tumorales se révélant fortement ERG et CD31-positives.

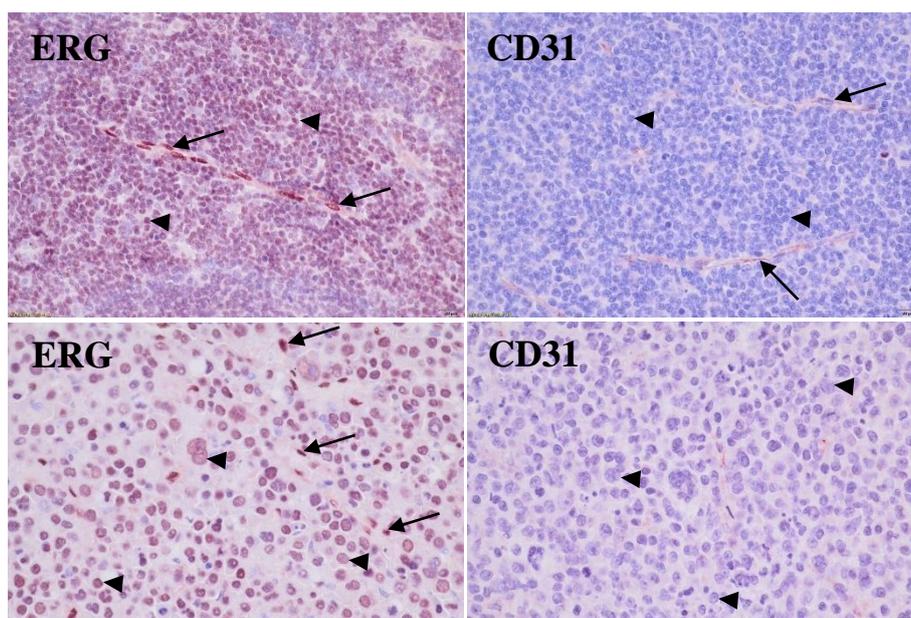


**Figure 43 : Observation microscopique de tumeurs initialement classées comme tumeurs non vasculaires, mais recatégorisées HSAs au vu des marquages.** Gauche : IHC avec un anticorps anti-ERG ; Droite : IHC avec un anticorps anti-CD31. Les images côte-à-côte correspondent au même cas. **A, B** : Cas diagnostiqué de sarcome histiocytaire montrant des marquages ERG et CD31 intenses des cellules tumorales. Ces cellules étaient négatives aux marquages IBA1, CD206, CD3 et PAX5. **C, D** : Cas supposé d'ostéosarcome télangiectasique présentant également des cellules tumorales fortement ERG et CD31-positives. Obj. x40. (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

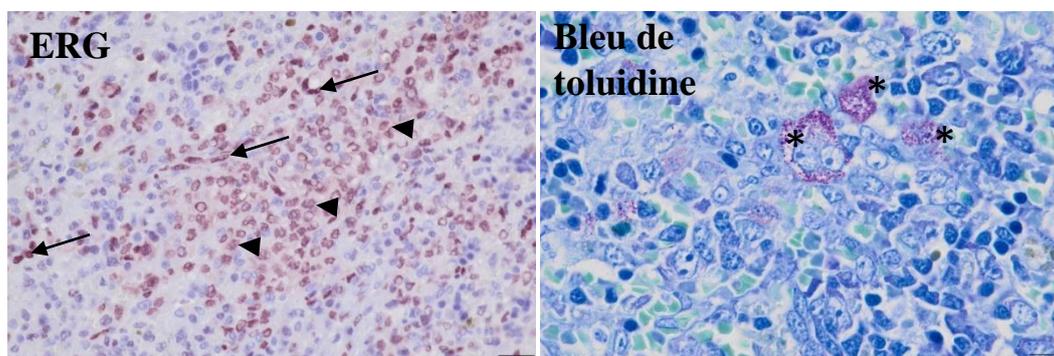
Pour les sarcomes histiocyaires et sarcomes à cellules dendritiques montrant un témoin positif marqué, aucun marquage des cellules tumorales par ERG et CD31 n'a été observé. Les marquages avec l'anticorps anti-ERG et, lorsqu'ils ont été réalisés, avec l'anticorps anti-CD31, étaient négatifs pour les carcinomes, le sarcome à cellules réticulées, le schwannome et le léiomyosarcome.

Les deux lymphomes se sont révélés ERG-positifs avec des marquages d'intensités moyennes, visibles sur la figure 44, de même que les deux mastocytomes. Ces deux types tumoraux étaient en revanche CD31-négatifs. L'un des mastocytomes, dont des images microscopiques sont visibles sur la figure 45, a été coloré au bleu de toluidine, montrant que les cellules ERG-positives correspondaient bien aux mastocytes tumoraux. Dans le cas de lymphangiome, les cellules endothéliales lymphatiques tumorales étaient fortement marquées par ERG et non marquées par CD31.

Le marquage ERG du cas de leucémie aiguë à mégacaryoblastes n'était pas interprétable car sa distribution était cytoplasmique, y compris sur les cellules endothéliales des vaisseaux présents au sein du prélèvement.



**Figure 44 : Observation microscopique d'un lymphome B (haut) et d'un lymphome T (bas) spléniques après IHC avec un anticorps anti-ERG (gauche) et anti-CD31 (droite).** Les deux types de lymphocytes tumoraux (extrémités de flèches) sont ERG-positifs, avec une intensité moyenne. Dans les deux cas, les cellules tumorales sont en revanche CD31-négatives. Lorsqu'ils sont présents, les vaisseaux intra-tumoraux sont bordés par des cellules endothéliales intensément marquées par ERG et CD31 (flèches). Obj. x40. (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)



**Figure 45 : Observation microscopique d'un mastocytome splénique après IHC avec un anticorps anti-ERG (gauche) et coloration au bleu de toluidine (droite).** ERG marque les cellules tumorales avec une intensité moyenne (extrémités de flèches), et des cellules endothéliales, non tumorales, moyennement à fortement (flèches). À droite, la coloration violette de grains cytoplasmiques par le bleu de toluidine (\*) confirme la nature mastocytaire des cellules marquées. Obj. x40 (gauche), x100 (droite). (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

## IV. Discussion

### A. Discussion sur le matériel et la méthode

#### 1. Choix de l'anticorps anti-ERG et validation

À notre connaissance, il n'existe à ce jour aucune étude réalisée avec le marqueur ERG chez le chien. De même, il n'existe aucun anticorps anti-ERG spécifiquement développé pour cette espèce, les anticorps disponibles au niveau commercial ciblant essentiellement les protéines de l'Homme ou de la souris. Pour notre étude, il a donc été nécessaire d'utiliser un anticorps développé contre la protéine ERG d'une autre espèce, l'Homme, et donc de s'assurer dans un premier temps que cet anticorps était utilisable chez le chien.

Les résultats de l'analyse bioinformatique ont confirmé que les protéines ERG humaines et canines présentent une forte homologie de séquence (supérieure à 95%), suggérant donc la forte probabilité que les anticorps développés pour reconnaître la protéine humaine croisent également chez le chien.

#### a. Choix de l'anticorps anti-ERG

Préalablement à ce travail de thèse, le choix du clone de l'anticorps anti-ERG utilisé a été réalisé sur les conseils d'une équipe du CRCL (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon) avec laquelle le laboratoire d'histologie de VetAgro Sup collabore régulièrement ; l'idée étant de pouvoir comparer plus facilement nos données obtenues chez le chien avec leurs données obtenues chez l'Homme. L'anticorps sélectionné a été le clone EP111 que nous avons obtenu chez le fournisseur Cell Marque. Il s'agit d'un anticorps monoclonal de lapin développé spécifiquement pour les marquages sur coupes en paraffine.

Dans la littérature, d'autres anticorps anti-ERG ont été décrits. Par exemple, l'anticorps monoclonal de souris clone 9FY a été utilisé dans l'étude de *Miettinen et al. (2011)* ayant permis de valider l'utilisation d'immunomarquages ERG sur les tumeurs vasculaires et carcinomes prostatiques humains. Un autre clone d'anticorps monoclonal de lapin, le clone EPR3864, est également disponible et a été utilisé dans d'autres études sur des tissus humains. (*Yaskiv et al., 2012*)

D'après *Yaskiv et al. (2012)*, la spécificité du marquage par ERG dépend de l'anticorps utilisé. L'anticorps monoclonal de souris 9FY est, chez l'humain, plus spécifique que l'anticorps monoclonal de lapin EPR3864 qui montre une réactivité de tumeurs mésenchymateuses non endothéliales (notamment les méningiomes). Cette moindre spécificité est notamment expliquée par l'existence d'une réaction croisée de l'anticorps avec le facteur de transcription FLI-1 (Friend leukemia integration-1), appartenant également à la famille des facteurs ETS. FLI-1 est entre autres exprimé dans les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques telles que les mégacaryocytes, et dans les cellules endothéliales au même titre qu'ERG, mais également dans les lymphocytes (*Li et al., 2015*), ce qui pourrait expliquer leur marquage par le clone EPR3864 et non par le clone 9FY. Le rôle de FLI-1 dans la genèse de certains cancers pourrait également expliquer la réactivité différente de ces tumeurs au marquage ERG selon l'anticorps utilisé.

Peu d'informations bibliographiques relatives au clone EP111 sont disponibles. Cependant, le clone EPR3864 reconnaît l'extrémité C-terminale de la protéine ERG, comme le clone EP111 sélectionné pour cette étude. Les alignements de séquences réalisés par bio-informatique montrent que cette partie de la protéine est la plus conservée entre l'Homme et le chien, et ne diffère que d'un acide aminé. Au contraire, l'anticorps monoclonal 9FY a pour épitope l'extrémité N-terminale de la protéine, qui d'après les alignements de séquences semble moins bien conservée entre les deux espèces, de même qu'au sein de l'espèce canine.

L'anticorps sélectionné serait donc plus adapté à notre étude sur le chien. Cependant, il nous a été impossible de comparer directement la séquence protéique de l'immunogène utilisé pour la production de l'anticorps anti-ERG avec les séquences des isoformes canines, cette dernière n'étant pas communiquée par le fournisseur. De plus, la comparaison de séquences présente la limite de ne pas tenir compte des modifications conformationnelles que peuvent induire des variations de la structure primaire de la protéine. Le changement d'un seul acide aminé peut parfois modifier complètement la structure tertiaire de la protéine et ainsi l'affinité de l'anticorps pour celle-ci. Cette étape donne malgré tout une première idée de la possibilité de réaction croisée entre l'anticorps anti-ERG et la protéine canine.

#### b. Validation par Western Blot

Lors de la construction du plan expérimental de l'étude, un Western Blot (WB) avait été prévu afin de valider l'existence d'une réaction croisée entre l'anticorps anti-ERG utilisé pour les immunomarquages et la protéine ERG du chien. Cependant, cette expérience n'a pas pu être mise à bien au cours des travaux de cette thèse.

Le WB est une technique fiable et adaptée à cette problématique. (Meuten, 2017) Ce procédé permet la détection de protéines d'intérêt au sein d'une solution. Il repose sur la migration d'une quantité connue de protéines, parmi lesquelles la protéine ciblée, par électrophorèse sur gel afin de les séparer selon leur charge et leur poids moléculaire. Ensuite, celles-ci sont transférées sur une membrane pour figer leur localisation. La protéine d'intérêt est alors révélée par hybridation avec l'anticorps primaire correspondant, lui-même couplé à un système d'amplification et de révélation du signal. (GE Healthcare Life Sciences, 2011) Cette technique peut être exploitée pour démontrer la liaison d'un anticorps à sa cible en utilisant des lysats de cellules supposées contenir l'antigène. Après migration et transfert des protéines contenues dans le lysat, la révélation fait intervenir l'anticorps à tester comme anticorps primaire. Si une bande apparaît à niveau du poids moléculaire attendu, elle indique la liaison de l'anticorps à l'antigène correspondant. Si d'autres bandes sont présentes en plus de celle-ci, cela signe que l'anticorps reconnaît probablement d'autres protéines. (Meuten, 2017)

Lors des travaux expérimentaux de cette thèse, la technique de WB a été mise au point à partir de lysats de cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC), obtenus après mise en culture de celles-ci. La manipulation réalisée sur ces solutions permettait d'obtenir, après révélation par l'anticorps anti-ERG couplé à un système chromogénique, une unique bande marquée à un poids moléculaire de 55 kDa, comme cela a déjà été décrit dans la littérature. (He *et al.*, 2015) Cependant, celle-ci n'a pas pu être effectuée sur des lysats de cellules endothéliales canines. En effet, un essai a été effectué en récupérant par grattage les cellules endothéliales aortiques de chiens, ces derniers ayant été sacrifiés pour un autre projet de recherche non lié à celui présenté dans cette thèse. Cependant, la lyse des culots cellulaires obtenus par ce procédé a permis la récupération d'une solution protéique de très faible concentration, de seulement 0,4 g/L de protéines, alors que les lysats protéiques d'HUVEC avaient une concentration de 1,7 à 2 g/L. Ainsi, il n'a pas été possible de former des échantillons contenant une quantité de protéines suffisante pour être révélée par le WB, et l'essai réalisé n'a pas permis de mettre en évidence de bande de protéine à l'issue de la révélation.

D'autres moyens de récupérer des cellules endothéliales canines en quantité suffisante sont actuellement en réflexion. Il est prévu que cette manipulation soit effectivement réalisée une fois ce problème technique surmonté, mais ceci n'a pas pu être fait avant la rédaction de cette thèse.

## 2. Choix de la rate comme organe d'étude

Pour ce projet, le choix a été fait d'étudier uniquement des tumeurs spléniques. En effet, le fait de restreindre l'étude à un seul organe a permis de faciliter la lecture des immunomarquages, une fois sa structure histologique étudiée et comprise. Le choix de l'organe s'est porté sur la rate au vu de l'importance des tumeurs vasculaires dans cet organe chez le chien, qui garantissait l'existence d'un nombre important de cas diagnostiqués comme tels dans les archives du laboratoire.

La richesse de la rate dans la quantité et la diversité des cellules qui la composent s'est révélée être à la fois une contrainte et un atout. En effet, celle-ci a compliqué la lecture et l'interprétation des marquages, notamment lorsqu'un doute sur la nature de cellules marquées était émis. Cependant, elle a aussi permis d'enrichir l'interprétation des marquages, du fait qu'elle contient des cellules des lignées hématopoïétiques, dont le marquage était intéressant à explorer au vu des données rapportées chez l'Homme. (Miettinen *et al.*, 2011; Yaskiv *et al.*, 2012) Une partie d'entre elles s'est en effet révélée positive à l'immunomarquage ERG. Ceci a permis de mieux cartographier l'expression du marqueur dans les cellules saines.

### 3. Plan expérimental de l'étude immunohistochimique

#### a. Choix de l'anticorps anti-CD31

Dans cette étude, le choix a été fait de comparer le marquage ERG au marquage CD31, plutôt qu'au marquage du FVIII-RA. En effet, CD31 est classiquement utilisé chez l'Homme comme marqueur des cellules endothéliales. (Miettinen, 2014) De plus, il est validé chez le chien, est plus sensible que le marquage FVIII-RA, et sa spécificité reste élevée. (Ferrer *et al.*, 1995; Meuten, 2017; Ramos-Vara *et al.*, 2018) Il semblait donc être un bon candidat pour cette comparaison. Le choix du clone était fondé sur le fait que la possibilité d'utiliser le clone JC/70A a été spécifiquement démontrée chez le chien. (Ramos-Vara *et al.*, 2018)

#### b. Aspect rétrospectif de l'étude et utilisation de blocs en paraffine

Les travaux présentés ici constituent une étude rétrospective. Ce type d'étude était le plus adapté dans notre cas. En effet, les seuls critères à connaître nécessairement pour inclure et analyser un cas étaient l'espèce de l'animal, l'organe atteint et le diagnostic prononcé. Les aspects cliniques ainsi que l'issue médicale post-diagnostic ne faisaient pas partie des critères projetés d'être analysés dans cette étude. Ainsi, tous les éléments préalables étaient inscrits dans le compte-rendu d'histologie, disponible directement dans la base de données du laboratoire. De plus, le stockage des prélèvements en blocs de paraffine après fixation au formaldéhyde assurait la disponibilité directe de prélèvements manipulables en quantité suffisante. À l'inverse, le choix d'une étude prospective, bien que permettant le recensement d'informations cliniques ou pronostiques, qui auraient pu apporter une éventuelle plus-value à l'étude, n'aurait pas permis le recrutement d'un nombre de cas aussi important, diminuant alors la représentativité de l'analyse immunohistochimique.

Les prélèvements utilisés étaient conservés en blocs FFPE (Formalin-Fixed Paraffin Embedded), c'est-à-dire fixés dans une solution de formaldéhyde après exérèse puis déshydratés et inclus dans un bloc de paraffine. Cette méthode est connue pour assurer une conservation fidèle de la structure tridimensionnelle d'un tissu, permettant l'analyse histologique plusieurs décennies après obtention du prélèvement. Les protéines présentes dans le prélèvement sont également conservées de façon satisfaisante par cette méthode, assurant l'interprétabilité d'une IHC après démasquage des antigènes. (Meuten, 2017)

Cependant, les protéines sont tout de même endommagées au cours du processus, ce qui peut artificiellement réduire l'intensité du marquage voire le négativer en cas de faible quantité initiale de protéines, de sur-fixation ou sous-fixation, ou stockage trop long. (Meuten, 2017; Donczo and Guttman, 2018) Ceci constitue une piste d'explication à l'absence totale de marquage CD31, y compris dans les cellules endothéliales saines, observée dans trois cas d'HSAs et un mastocytome. Ici, l'hypothèse d'une fixation non optimale est privilégiée, pour plusieurs raisons. D'une part, l'antigène CD31 est normalement exprimé en quantité importante par les cellules endothéliales saines, comme cela a pu être objectivé par le marquage d'autres échantillons. De plus, ces cas appartenaient à des séries de lames préparées ensemble, au sein desquelles d'autres lames étaient correctement marquées, rendant peu probable la possibilité d'une erreur de manipulation.

Par ailleurs, le stockage des blocs ne semble pas non plus être une cause possible de ce défaut de marquage, du fait que les prélèvements concernés aient été stockés dans les mêmes conditions que les autres et que, datant de 2016 et 2019, ils n'étaient pas parmi ceux ayant été stockés le plus longuement. L'IHC anti-CD31 ayant été rapportée peu sensible à une surfixation (Webster *et al.*, 2009), l'hypothèse d'une fixation insuffisante est donc préférée. Une fixation non optimale constitue également une piste d'explication à l'absence totale de marquage ERG, y compris dans l'endothélium normal, dans un cas de sarcome histiocytaire et un cas de tumeur stromale. L'absence totale de marquage CD31 ayant été plus fréquente (quatre cas sur 82 marquages) que l'absence de marquage ERG (trois cas sur 200 marquages), il semble que la protéine ERG soit plus résistante aux défauts de fixation que le CD31. Ceci lui conférerait un avantage lors de l'utilisation de méthodes immunohistochimiques, les tissus tumoraux testés ayant des durées de fixation très variables, souvent longues pour la rate qui est riche en sang.

Malgré ces quelques cas, l'utilisation de blocs FFPE s'est avérée performante au vu du fait que l'ensemble des blocs relatifs aux autres cas étudiés était associé à un marquage de l'endothélium vasculaire sain.

### c. Cas recrutés pour les immunomarquages

Pour cette étude, des immunomarquages d'organes sains n'ont pas été réalisés, bien que ceux-ci auraient été souhaités. Cependant, la présence fréquente de portions de rate non infiltrée par le processus néoplasique sur les prélèvements étudiés, ainsi que d'un nœud lymphatique dans un bloc de tumeur stromale, ont permis d'obtenir une idée générale du marquage ERG de ces tissus. Il n'est néanmoins pas exclu que l'activité transcriptionnelle des cellules présentes soit modifiée en réaction à la présence d'une tumeur dans l'organe, et que l'expression d'*ERG* soit ainsi modifiée par rapport à son niveau basal. Cependant, au vu du fait que la positivité des cellules était homogène d'un cas à l'autre, y compris pour des tumeurs de natures différentes, il est probable que la réactivité normale des cellules au marquage ait été observée. La réalisation d'immunomarquages ERG sur des prélèvements spléniques de chiens sains serait tout de même utile pour confirmer les observations relatées dans cette étude.

La méthode de recrutement des cas a permis l'inclusion finale de 65 cas de tumeurs vasculaires, attendues marquées avec l'anticorps anti-*ERG*, et 117 tumeurs stromales attendues négatives. Afin de valider l'usage d'une méthode diagnostique immunohistochimique, il est recommandé un essai initial de cette méthode sur au moins 10 cas attendus positifs et 10 cas attendus négatifs. (Lin and Chen, 2014) La quantité de cas recrutés était donc suffisante pour permettre une analyse pertinente. L'addition de 18 tumeurs spléniques rares ou particulières a permis d'explorer l'éventuelle réactivité d'autres tumeurs au marquage ERG.

De plus, le marquage des 117 cas de tumeurs stromales spléniques a également permis de tester le marquage ERG dans des conditions proches d'une utilisation en routine. En effet, l'utilisation prévue du marqueur ERG ne comprendrait pas les cas d'HSAs de morphologie caractéristique, mais plutôt de tumeurs peu différenciées dont l'origine endothéliale n'est pas exclue. Au vu du fait qu'un HSA peu différencié pourrait être diagnostiqué à tort sarcome stromal, il a été considéré possible que notre panel de tumeurs stromales contienne quelques HSAs mal classifiés. En somme, ces marquages avaient pour but de valider l'intérêt du marqueur ERG pour l'identification d'une tumeur présentant des aspects architecturaux ou morphologiques compatibles avec une origine vasculaire mais insuffisants pour permettre le diagnostic. A posteriori, cette capacité a été également montrée lors de la recatégorisation en HSAs de deux cas de tumeurs appartenant au groupe des tumeurs spléniques particulières ou rares.

Lors de la recatégorisation d'une tumeur en HSA, la condition nécessaire était la positivité concomitante des cellules tumorales aux marquages ERG et CD31. La possibilité que cette recatégorisation soit erronée, et que ces tumeurs appartiennent à un autre type tumoral, est faible. En effet, les données bibliographiques et les observations menées dans cette étude tendent à indiquer qu'ERG et CD31 marquent, outre les tumeurs endothéliales, des types tumoraux différents. Cet aspect est détaillé plus tard dans la discussion. Ainsi, les tumeurs non endothéliales ERG-positives apparaissent généralement CD31-négatives, et vice-versa. En outre, lorsque la morphologie cellulaire entraînait la persistance d'un doute sur l'origine endothéliale malgré la positivité des marquages ERG et CD31, des marquages supplémentaires étaient réalisés, et ont toujours entraîné l'exclusion des autres hypothèses considérées.

#### d. Choix des témoins de marquage

Les témoins positifs et négatifs d'un immunomarquage sont le gage de la qualité du procédé de marquage mis en œuvre, ainsi que du bon fonctionnement des réactifs. Des témoins sont donc nécessaires pour chaque série de marquage, c'est-à-dire pour chaque ensemble de lames marquées au cours d'une même manipulation.

Lors de la réalisation des immunomarquages, un témoin négatif systématique a été fourni pour chaque bloc marqué. Sa réalisation suivait toutes les étapes des immunomarquages classiques, à l'exception de l'étape d'incubation avec l'anticorps primaire, remplacé par du PBS. Ce témoin permettait donc de vérifier la spécificité de la liaison anticorps primaire-anticorps secondaire-complexe avidine biotine, ainsi que l'efficacité du blocage de la peroxydase endogène. Si ces étapes ne fonctionnaient pas comme prévu, un marquage aurait été observé sur les lames témoin d'une même série, de localisation aléatoire ou non, mais de répartition différente que celle usuellement observée dans les immunomarquages. Au cours de cette étude, aucun des témoins négatifs n'a fait l'objet d'un marquage inattendu.

Le témoin positif choisi était un témoin positif intrinsèque au prélèvement, composé par l'endothélium des vaisseaux non tumoraux. La positivité de ce témoin permettait de valider la bonne réalisation des étapes de démasquage des antigènes et de révélation. Un défaut de témoin positif signait soit un problème de manipulation, qui pouvait être contrôlé en observant le témoin positif d'une autre lame de la même série, soit un défaut lié à l'antigène recherché sur le prélèvement en question. Dans tous les cas, il entraînait la non-analyse du marquage.

Le choix de ne pas fournir de témoin extrinsèque, c'est-à-dire une lame dont on sait qu'elle contient des cellules positives, marquée en même temps que chaque série de marquages, s'est justifié par le fait que les échantillons de tumeurs contenaient presque tous des portions de rate non infiltrée par la tumeur. Ceci assurait la présence d'au moins une lame contenant des cellules endothéliales saines par série de 18 marquages, valant de témoin positif extrinsèque pour les éventuels prélèvements de la série ne contenant pas de témoin positif intrinsèque.

#### e. Méthode de lecture des immunomarquages

Lors de la lecture des immunomarquages, après validation du marquage par observation des témoins positif et négatif, plusieurs éléments doivent être notés. D'une part, la distinction des types cellulaires marqués est indispensable. Lors d'un marquage de cellules tumorales, plusieurs méthodes de lecture sont possibles. Dans certains cas, le pourcentage de cellules tumorales marquées, déterminé généralement de façon semi-quantitative par l'observateur, est noté. Un autre élément observable est l'intensité avec laquelle le marquage apparaît dans les cellules concernées. Celle-ci est établie sur chaque lame de façon indépendante, par comparaison de l'intensité de marquage des cellules tumorales avec les extrêmes d'intensité observés sur les cellules marquées dans les zones non tumorales. (Lin and Chen, 2014; Meuten, 2017) La notation de ces deux caractéristiques est par exemple intéressante lors de l'étude d'un lien entre ce pourcentage de cellules marquées et/ou l'intensité de marquage, et le pronostic ou la réponse à un traitement.

Dans ce travail, le pourcentage de cellules tumorales marquées n'a pas été déterminé, mais l'intensité du signal au niveau des cellules tumorales a été rapportée pour chaque cas, afin d'évaluer plus précisément la lisibilité de marquage ERG et d'étoffer sa comparaison avec CD31. Par exemple, un marquage d'intensité faible peut parfois porter les pathologistes à confusion, et entraîner une notation différente de la tumeur vis-à-vis de sa positivité au marquage. La présence fréquente d'un marquage d'intensité faible des cellules tumorales appellerait donc à la prudence lors de la validation du marquage.

Lorsque le marquage d'une population cellulaire était hétérogène sur une même lame, l'intensité de marquage retenue était la plus forte observée, car il a été supposé que lors d'une utilisation en routine du marqueur, la positivité allait être interprétée au sein des zones les plus nettement marquées.

## B. Discussion sur les résultats

### 1. Hétérogénéité architecturale et morphologique des tumeurs vasculaires

Les 65 cas de tumeurs endothéliales observés ont montré, comme attendu, une grande hétérogénéité d'architectures et de morphologies. En effet, les HSAs pouvaient se présenter sous la forme d'amas de cellules tumorales très nombreuses et compactes, ou d'une quantité plus faible de cellules formant des espaces vasculaires irréguliers, accompagnées d'un microenvironnement riche en cellules diverses. La morphologie des cellules tumorales était également variable, pouvant aller d'un aspect fusiforme à cubique, voire de cellules anaplasiques de grande taille. De façon intéressante, cette diversité morphologique n'existait pas seulement d'une tumeur à l'autre, mais également au sein d'une même tumeur. Cela confirme les observations relatées dans la documentation étudiée. (Day *et al.*, 1995; Kiehl and Calderwood Mays, 2016; Meuten, 2017)

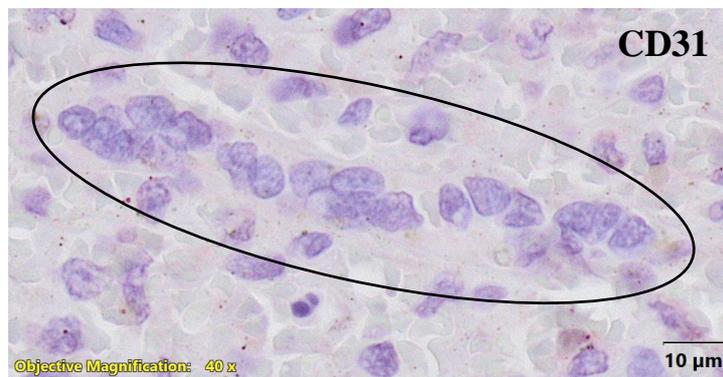
En outre, cette hétérogénéité s'est confirmée par une variabilité des marquages observés, bien souvent au sein d'une même lame. Qu'il s'agisse d'ERG ou de CD31, certaines zones étaient marquées avec une intensité variable, et certaines cellules tumorales étaient marquées alors que d'autres ne l'étaient pas. Cela est cohérent avec la complexité des maladies tumorales, et avec la variabilité génétique et épigénétique des cellules cancéreuses, qui peuvent perdre l'expression de certains marqueurs au cours de leur transformation. (Hanahan and Weinberg, 2011) Ces variations peuvent également être le reflet de conditions de fixation non homogènes au sein d'un prélèvement, la zone périphérique étant plus longuement en contact avec le fixateur que la zone centrale.

### 2. Validité de l'anticorps anti-ERG pour identifier les cellules endothéliales spléniques de chien

#### a. Sensibilité et spécificité du marquage sur les populations cellulaires spléniques normales

Dans des manipulations préliminaires antérieures aux travaux de cette thèse, menées par l'équipe du laboratoire, des organes sains de chiens (rate, ganglion lymphatique, peau) ont été utilisés pour tester par IHC la réactivité de l'anticorps anti-ERG sélectionné. Il est ainsi apparu que les cellules endothéliales normales étaient intensément et uniformément marquées dans ces organes. Dans cette thèse, la présence de nombreuses portions de rate saine sur les prélèvements tumoraux observés a permis une caractérisation plus précise des populations cellulaires spléniques normales, endothéliales ou non endothéliales, exprimant cette protéine.

Les cellules endothéliales de l'ensemble de structures vasculaires de la rate étaient marquées avec l'anticorps anti-ERG. Cependant, nous avons été très surpris de constater que, lorsque nous avons utilisé l'anticorps anti-CD31, pourtant classiquement employé pour identifier les cellules endothéliales, certaines structures vasculaires de la rate normale étaient CD31-négatives. Ces structures vasculaires, toujours de même architecture et toujours dans la pulpe rouge, se présentaient sous la forme de vaisseaux à petite lumière régulière, contenant des cellules sanguines circulantes, tapissée par de nombreuses petites cellules endothéliales à noyau cubique. (Figure 46) Si le positionnement de ces structures dans l'arborisation vasculaire de la rate n'était pas clair, elles semblaient correspondre aux parties veineuses de la circulation fermée.



**Figure 46 : Observation microscopique d'un vaisseau de morphologie représentative de la population de vaisseaux aux cellules endothéliales ERG-positives et CD31-négatives, en coupe longitudinale, après IHC avec un anticorps anti-CD31.** Le vaisseau, dont les cellules endothéliales ne sont pas marquées, correspond à la structure linéaire encerclée. Obj. x 40. (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

Dans une étude faite chez l'Homme, où la distribution de différents marqueurs endothéliaux a été évaluée dans des tissus sains, l'immunomarquage avec l'anticorps anti-CD31 était positif dans tous les types de cellules endothéliales des reins, poumons, foie et nœuds lymphatiques. Cependant, dans la rate, pour un certain type de vaisseaux, les cellules endothéliales étaient CD31-négatives. Ces vaisseaux ont été identifiés par les auteurs comme des capillaires spléniques. (Pusztaszeri *et al.*, 2006) Notre observation ainsi que celle de ces auteurs suggèrent donc fortement que, pour une partie des vaisseaux spléniques, les cellules endothéliales n'expriment pas le CD31.

Le marquage ERG des cellules endothéliales tapissant les vaisseaux lymphatiques a également été recherché. Or, il est très difficile de distinguer sur une coupe de rate un vaisseau lymphatique d'une petite structure veineuse. Aussi, nous avons profité de la présence sur un échantillon d'une portion de ganglion lymphatique pour analyser le marquage des cellules endothéliales tapissant les sinus lymphatiques. Sur ce ganglion, nous avons observé une positivité de l'ensemble des cellules endothéliales lymphatiques avec l'anticorps anti-ERG, ce qui est cohérent avec les observations réalisées chez l'Homme. (Miettinen *et al.*, 2011) Par analogie, nous avons donc supposé que les cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux lymphatiques de la rate sont bien ERG-positives, mais cette hypothèse devrait être étudiée ultérieurement.

Outre les cellules endothéliales saines, d'autres cellules spléniques ont présenté un marquage avec l'anticorps anti-ERG :

- ❖ Un marquage nucléaire des lymphocytes, généralement d'intensité faible, a été mis en évidence. La même observation avait été faite chez l'Homme, mais uniquement lors de l'utilisation d'un anticorps ciblant, comme le nôtre, l'extrémité C-terminale de la protéine. (Yaskiv *et al.*, 2012) Ce résultat n'est donc pas surprenant. Cependant, chez l'Homme, l'expression du facteur de transcription ERG n'a été rapportée dans les lignées lymphocytaires qu'aux stades immatures ainsi que dans les lymphocytes B matures. L'expression d'ERG dans les lymphocytes T matures normaux n'est en revanche pas rapportée, et sa présence aberrante dans les cellules T est au contraire associée à des leucémies lymphoblastiques aiguës. (Adamo and Ladomery, 2016) Sur les lames de ce projet, l'ensemble des lymphocytes était faiblement marqué, sans différence apparente entre les zones peuplées en majorité de lymphocytes T (MLPA par exemple) et celles riches en lymphocytes B (follicules lymphoïdes). Une caractérisation plus précise du marquage ERG des populations lymphocytaires T et B, spléniques et extra-spléniques, serait intéressante.
- ❖ Dans cette étude, des amas, dans la pulpe rouge, de cellules myéloïdes immatures et matures, notamment de la lignée neutrophilique, présentaient régulièrement un marquage nucléaire. Pour ces cellules, l'intensité du marquage était moyenne à forte. Chez l'Homme, seules les cellules myéloïdes immatures ont été rapportées ERG-positives. (Miettinen *et al.*, 2011) Cette différence chez le chien pourrait s'expliquer par une persistance plus longue de l'expression du gène *ERG* dans ces cellules, jusque dans les formes matures. L'hypothèse que cette observation soit due à la reconnaissance par l'anticorps d'une autre protéine nucléaire qu'ERG dans ces cellules est en revanche peu probable.
- ❖ Sur les portions de rate saine, nous avons pu observer un marquage nucléaire systématique des mégacaryocytes matures. Compte tenu du rôle connu de la protéine ERG dans la mégacaryopoïèse chez l'Homme (Salek-Ardakani *et al.*, 2009), ce résultat n'est pas surprenant et rejoint les observations faites sur la lignée myéloïde neutrophilique.

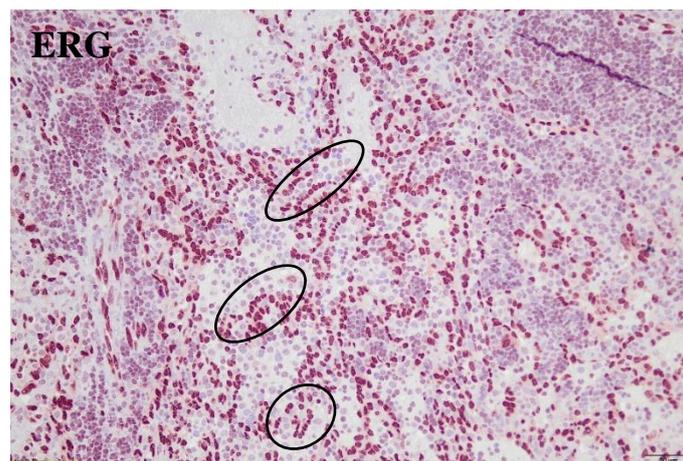
## b. Sensibilité et spécificité du marquage sur les tumeurs spléniques

### i. Sensibilité du marquage ERG pour les tumeurs vasculaires spléniques

Sur les 65 cas de tumeurs vasculaires spléniques, bénignes et malignes confondues, l'immunomarquage avec l'anticorps anti-ERG était positif dans 100 % des cas. La plupart du temps (97 % des cas), celui-ci était d'intensité forte ou moyenne, rendant l'interprétation du marquage des cellules tumorales sans équivoque. Dans un cas d'hémangiome et un cas d'HSA, cependant, les cellules tumorales étaient faiblement marquées. L'interprétation d'un immunomarquage étant en partie sujette à la subjectivité de l'observateur, il n'est pas impossible que ces cas aient pu être considérés comme négatifs par un tiers. Malgré tout, **l'immunomarquage ERG a montré ici une sensibilité très élevée pour les tumeurs endothéliales spléniques. Le marquage était la plupart du temps net, intense et facile d'interprétation.** Ces caractéristiques sont intéressantes pour l'application de ce marqueur dans un contexte diagnostique.

Aucune différence dans l'apparence ou l'intensité du marquage entre les tumeurs vasculaires bénignes et malignes n'a pu être observée. Il apparaît que l'utilisation de l'anticorps anti-ERG ne permettra pas de distinguer un hémangiome d'un HSA en cas de doute à l'issue de l'analyse histologique conventionnelle sur la lame en HE.

Afin d'évaluer l'intérêt du marqueur ERG en termes de sensibilité ou de facilité de lecture par rapport à un marqueur de référence, nous avons utilisé un anticorps anti-CD31 sur l'ensemble des tumeurs vasculaires spléniques. Seulement 90 % des tumeurs vasculaires spléniques ainsi testées se sont avérées positives (55 cas sur les 61 interprétables). Pour six cas, les cellules tumorales qui étaient bien ERG-positives étaient CD31-négatives. Il est probable que pour ces cas (deux hémangiomes et quatre HSAs) le point de départ de la tumeur soit les cellules endothéliales qui tapissent les structures vasculaires spléniques identifiées comme CD31-négatives sur les portions de rate saine. D'ailleurs, une certaine convergence morphologique et architecturale entre certaines de ces tumeurs et les vaisseaux CD31-négatifs précédemment décrits a été observée. (Figure 47) Cependant, l'hypothèse que la négativité de ces tumeurs au marquage CD31 soit due, non pas à une absence constitutive de cette protéine au sein de ces cellules, mais plutôt à une perte de son expression au cours du processus oncogénique, ne peut pas être exclue.



**Figure 47 : Observation microscopique d'une tumeur vasculaire ERG-positif et CD31-négatif, après IHC avec un anticorps anti-ERG.** Les cellules tumorales ont une morphologie et une organisation architecturale (en file-indienne) semblable à celle des cellules endothéliales ERG-positives et CD31-négatives normales présentées dans la figure 46 (structures cerclées). Obj. x20. (Source : T. Marchal, VetAgro Sup)

À propos de la sensibilité des marqueurs ERG et CD31 pour les cellules endothéliales tumorales, une attention particulière doit être portée aux tumeurs vasculaires d'origine lymphatique. En effet, un lymphangiome splénique était inclus dans notre troisième groupe d'étude. Ces tumeurs sont particulièrement rares. (Dyer and Jennings, 2016) Ici, les cellules tumorales exprimaient fortement ERG, mais pas CD31. (Tableau XII) Pour rappel, sur la portion de ganglion lymphatique sain également observée, les cellules endothéliales normales bordant les sinus lymphatiques étaient bien CD31-positives et ERG-positives.

Des données précédemment publiées indiquent que les cellules endothéliales lymphatiques sont normalement CD31-positives chez le chien. (Ferrer *et al.*, 1995; Ramos-Vara *et al.*, 2018) Seulement, ce marquage a parfois été décrit comme moins intense que celui des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. (Ferrer *et al.*, 1995) En ce qui concerne les lymphangiomes, peu de données sont disponibles, mais des cas positifs au marquage avec un anticorps anti-CD31 ont été décrits chez le chien. (Gamlem and Nordstoga, 2008; Ramírez *et al.*, 2020) Ces résultats suggèrent que le marquage des cellules endothéliales lymphatiques par un anticorps anti-CD31 est normalement présent, mais moins constant que le marquage obtenu sur les cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins, à l'image de ce qui a été rapporté chez l'Homme. (Fukunaga, 2005; Pusztaszeri *et al.*, 2006) À l'inverse, le marquage ERG semble systématiquement positif dans l'endothélium lymphatique, mais ainsi non discriminant entre les deux types d'endothéliums. Afin de mieux caractériser l'immunoréactivité de l'endothélium lymphatique pour ces deux marqueurs, la réalisation d'IHC sur une quantité plus importante de tissus riches en vaisseaux lymphatiques (peau, nœuds lymphatiques) serait intéressante ; de même que la comparaison des résultats obtenus avec d'autres marqueurs spécifiques des cellules endothéliales lymphatiques tels que PROX-1 et LYVE-1 (Halsey *et al.*, 2016), ou encore la podoplanine (Wittenberns *et al.*, 2021). Il est aussi possible que ce cas classé comme lymphangiome soit en fait une tumeur vasculaire sanguine, de même nature que les six cas ERG-positifs et CD31-négatifs discutés précédemment.

La facilité de lecture et d'interprétation des marquages a également été explorée. Dans une étude, Kim *et al.* (2013) ont demandé à huit anatomopathologistes travaillant sur des tissus humains d'observer des lames de tumeurs marquées par ERG et CD31, dans le but d'évaluer l'utilité de ces marquages pour détecter plus facilement une infiltration intravasculaire, lymphatique ou sanguine, par des embolus tumoraux. Une de leurs observations est que le marquage ERG des structures vasculaires est globalement d'interprétation plus facile que leur marquage par CD31. La raison en est la topographie nucléaire du marquage avec ERG, qui permet de mieux identifier chaque cellule marquée que la topographie membranaire obtenue avec CD31. La même constatation a été faite lors de cette thèse. En effet, le marquage membranaire de CD31 rend plus difficile le fait de rattacher un élément marqué à une cellule en particulier. Ceci est d'autant plus vrai que le marquage CD31 était parfois discontinu, voire focal. En revanche, **le marquage ERG apparaissait la plupart du temps beaucoup plus lisible**, sa répartition nucléaire permettant une bonne individualisation des cellules marquées. D'autre part, l'intensité du marquage obtenu avec ERG était forte pour 86% des cas, alors que seulement 69 % des cas traités avec CD31 ont atteint ce niveau d'intensité. Cette intensité plus importante du signal obtenu offre un confort de lecture pour le pathologiste.

## ii. Spécificité du marquage ERG

### ❖ Tumeurs stromales spléniques

Afin d'explorer la spécificité du marqueur ERG pour les tumeurs vasculaires, 117 cas de tumeurs stromales ont été inclus dans l'étude. Pour rappel, ce groupe de tumeurs, auparavant qualifiées de « tumeurs mésenchymateuses non lymphoïdes et non vasculaires », comprend des tumeurs spléniques d'origines diverses (fibroblastique, musculaire, adipocytaire, histiocytaire, cellules réticulées) caractérisées par une morphologie fusiforme et une organisation plus ou moins lâche en faisceaux ou en plages. Fréquemment, des plages d'hématies libres intercalées entre les cellules tumorales y sont observées, et peuvent suggérer une origine vasculaire du processus en cours, pouvant être à l'origine d'un diagnostic erroné d'HSA. Réciproquement, un HSA peu différencié peut aussi être diagnostiqué tumeur stromale par erreur. (Robinson and Robinson, 2016; Meuten, 2017; Wittenberns *et al.*, 2021) Cent seize de ces 117 cas ont pu être interprétés. Parmi eux, 112 étaient ERG-négatifs, mais pour quatre cas les cellules tumorales exprimaient la protéine ERG.

Pour deux de ces cas, la positivité obtenue en utilisant un anticorps anti-CD31 a permis de reclasser ces tumeurs en HSAs. Ainsi, il apparaît qu'ERG est performant pour déceler des tumeurs vasculaires, même dans des cas où leur apparence s'éloigne de l'aspect classique d'un hémangiosarcome. Ceci est intéressant à noter au vu du fait que l'usage d'un marqueur diagnostique est plutôt cantonné aux tumeurs peu différenciées ou d'apparence trompeuse, qu'à celles dont le diagnostic apparaît sans équivoque en coloration classique.

Dans les deux autres cas, cependant, les cellules tumorales se sont avérées CD31-négatives, suggérant qu'il ne s'agissait pas d'HSAs. Cependant, au vu de l'existence d'HSA ERG-positifs et CD31-négatifs, l'origine endothéliale ne peut pas non plus être formellement exclue. Malgré cela, la morphologie des cellules tumorales dans ces deux cas plaide peu en faveur de cette hypothèse, et plutôt en faveur d'une origine hématogène. Les marquages complémentaires réalisés (CD3, PAX5) n'ont pas permis d'indiquer une origine lymphoïde. L'hypothèse d'une origine myéloïde des cellules tumorales reste par contre possible, étant donné la positivité fréquente pour ERG de cellules de la lignée myéloïde. Cette hypothèse n'a pas pu être explorée du fait de l'absence de disponibilité d'un marqueur myéloïde utilisable sur des coupes en paraffine. Cette hypothèse est néanmoins cohérente avec les données connues pour l'Homme chez qui certaines leucémies myéloïdes aiguës sont ERG-positives. (Miettinen *et al.*, 2013) Enfin, la positivité de ces tumeurs pourrait être due à un défaut de spécificité du marquage ERG, qui marquerait les sarcomes stromaux spléniques en faible proportion. Au vu des informations connues à l'issue des travaux, il est impossible de prononcer une conclusion définitive quant à ces deux cas.

**Finalement, 98 % des tumeurs stromales étudiées (112/114) étaient ERG-négatives.**

### ❖ Tumeurs spléniques particulières ou rares

L'étude des données bibliographiques concernant la distribution cellulaire de la protéine ERG chez l'Homme laissait supposer que d'autres populations cellulaires que les cellules endothéliales sanguines et lymphatiques pourraient être observées marquées chez le chien. De fait, cela a été le cas. Ainsi, des tumeurs spléniques particulières ou rares, non vasculaires, ont également été incluses dans l'étude, afin d'explorer la réactivité d'autres types tumoraux au marquage ERG.

Parmi ces tumeurs, cinq tumeurs hématologiques étaient présentes (deux lymphomes, deux mastocytomes et une leucémie mégacaryoblastique), ainsi que cinq tumeurs histiocytaires (trois sarcomes d'origine macrophagique et deux sarcomes à cellules dendritiques), quatre tumeurs mésenchymateuses typées sur des bases morphologique et immunohistochimiques, trois carcinomes et un lymphangiome.

Les trois carcinomes se sont révélés négatifs, mais leur origine non prostatique relativise la portée de cette observation. Chez l'Homme, en effet, une fraction importante des carcinomes prostatiques (et quasi-uniquement ceux d'origine prostatique) sont ERG-positifs.

Dans le groupe des tumeurs mésenchymateuses, seules les cellules tumorales du cas d'ostéosarcome télangiectasique ont montré une positivité avec notre anticorps, également observée avec l'anticorps anti-CD31. Cette tumeur était caractérisée par des plages de cellules allongées, de taille moyenne, au cytoplasme éosinophile, montrant entre elles des dépôts matriciels acidophiles compatibles avec de l'ostéoïde et semblant parfois délimiter des espaces vasculaires. Les cellules tumorales étaient FVIII-RA-négatives, d'où le diagnostic proposé initialement. Or, à l'issue des examens immunohistochimiques, nous avons finalement conclu qu'il s'agissait d'une forme particulière d'HSA. La négativité du FVIII-RA s'explique par sa sensibilité non-optimale pour les tumeurs vasculaires. Par ailleurs, l'absence de marquage des autres tumeurs de ce groupe est encourageante vis-à-vis de l'utilisation du marquage ERG pour distinguer un HSA d'une autre tumeur mésenchymateuse.

Dans le groupe des tumeurs histiocytaires, les tumeurs pour lesquelles le marquage était interprétable (4/5), ont montré une négativité pour ERG dans trois cas sur quatre, et l'unique cas positif s'est finalement avéré être aussi un HSA. Pour ce dernier cas, les cellules tumorales étaient non seulement ERG-positives mais aussi CD31-positives. Si, chez l'Homme, des sarcomes histiocytaires ont été rapportés CD31-positifs (McKay *et al.*, 2012), cela n'a pas été observé chez le chien (Ramos-Vara *et al.*, 2018). Cette tumeur était caractérisée par des plages de cellules rondes semblant focalement former une trame. Ces cellules, de taille moyenne, étaient quelques fois plurinucléées, et des hématies étaient parfois présentes dans leur cytoplasme. Ce sont ces images d'érythrophagocytose, ainsi que la présence de cellules plurinucléées qui ont incité le pathologiste à proposer l'hypothèse de sarcome macrophagique. Or, les marquages réalisés dans cette thèse ont permis de reclasser cette tumeur parmi les HSAs. Il est à noter qu'il n'est pas rare d'observer des images de cytophagocytose dans un contingent de cellules tumorales peu différenciées, en particulier lorsqu'elles sont d'origine épithéliale ou vasculaire. En effet, en situation néoplasique, cette capacité n'est pas l'apanage exclusif des tumeurs d'origine macrophagique. (Wang *et al.*, 2019)

Dans le groupe des tumeurs hématologiques, pour les quatre cas interprétables (4/5), les cellules tumorales étaient positives au marquage avec l'anticorps anti-ERG. Le marquage de certaines cellules hématopoïétiques spléniques normales ayant été observé, un marquage ERG des tumeurs ayant pour origine ces cellules, comme les lymphomes et les leucémies myéloïdes, était plutôt attendu. Ceci a été confirmé pour les deux cas de lymphomes, d'immunophénotypes respectifs T et B, les deux étant marqués par ERG avec une intensité faible. Par ailleurs, concernant le cas de leucémie aiguë à mégacaryoblastes inclus dans ce groupe, il était envisagé que les cellules tumorales puissent être ERG-positives, mais ceci n'a pas pu être formellement vérifié. Une distribution anormale du marquage obtenu, qui était cytoplasmique et non nucléaire pour la totalité des cellules marquées, a rendu l'interprétation de ces résultats complexe, même en considérant le fait la protéine ERG, notamment certaines de ses isoformes, puisse être retrouvée en situation intracytoplasmique dans certaines circonstances.

De façon plus inattendue, bien que finalement en accord avec le marquage ERG de populations cellulaires hématologiques normales dans la rate, les deux cas de mastocytomes étudiés (extension splénique de tumeurs cutanées) étaient ERG-positifs. Les mastocytes sont considérés comme des cellules d'origine myéloïde. Ces cellules peuvent subir une transformation tumorale, donnant lieu à un mastocytome, tumeur très fréquente chez le chien et très rare chez l'Homme. (Willmann *et al.*, 2019) Les mastocytomes adviennent le plus souvent dans la peau et le tissu sous-cutané, mais peuvent aussi atteindre des organes viscéraux tels que la rate, de façon primitive ou, plus fréquemment, métastatique. (Meuten, 2017) Dans notre étude, les deux cas de mastocytomes étudiés ont montré une positivité d'intensité moyenne. Dans un des deux cas, les cellules tumorales étaient de grande taille, avec un gros noyau nucléolé siège de mitoses anormales, et un cytoplasme important contenant rarement des grains, plutôt éosinophiles que basophiles. Cette morphologie évoquait fortement la morphologie de cellules myéloïdes, mais de stade peu différencié, blastique. Il n'est pas impossible que ces cellules aient pu par exemple être des précurseurs myéloïdes de la lignée mastocytaire. Cependant, une coloration spéciale au bleu de toluidine a confirmé la présence de mastocytes bien différenciés dans le contingent de cellules tumorales ERG-positives, appuyant le diagnostic de mastocytome. La cause de la positivité des tumeurs mastocytaires n'est pas connue, mais pourrait être liée à l'appartenance des mastocytes à la lignée myéloïde. Au cours des observations de portions de rate saine, aucun prélèvement n'a permis d'observer des mastocytes positifs mais, en dehors du cas d'infiltration secondaire par un mastocytome, la présence de mastocytes dans la rate est peu fréquente à rare chez le chien. Des marquages d'organes riches en mastocytes, tels que la peau ou l'intestin, avec l'anticorps anti-ERG, pourraient permettre d'évaluer la présence du facteur ERG dans les mastocytes sains. Aucune donnée concernant le marquage ERG de mastocytomes chez l'Homme n'a pu être trouvée, probablement du fait de la rareté de cette tumeur dans cette espèce.

### 3. Bilan : Application du marquage ERG au diagnostic immunohistochimique des tumeurs vasculaires spléniques canines

#### ❖ Sensibilité

Lors de ces travaux, nous avons mis en évidence une grande sensibilité de la reconnaissance immunohistochimique de la protéine ERG pour l'identification des tumeurs d'origine endothéliale sanguine ou lymphatique, puisque 100% de ces tumeurs ont été marquées avec l'anticorps anti-ERG choisi. De plus, cette méthode a entraîné la reclassification en hémangiosarcome de quatre tumeurs auparavant classées comme tumeurs mésenchymateuses non lymphoïdes et non vasculaires, indiquant que cet anticorps permet, en outre, de détecter les HSAs peu différenciés.

**La sensibilité du marquage ERG pour ces tumeurs est supérieure à celle obtenue avec le marqueur CD31**, jusque-là utilisé chez le chien comme marqueur de référence pour les tumeurs vasculaires. La protéine ERG est en particulier présente dans les cellules endothéliales d'une portion bien précise de l'arborisation vasculaire splénique, qui dans cette localisation n'expriment pas le CD31. Ceci pourrait expliquer la négativité de certaines tumeurs vasculaires spléniques pour CD31 alors même qu'elles sont ERG-positives.

#### ❖ Spécificité

En contrepartie, la protéine ERG semble produite de manière constitutive par de nombreuses cellules hématopoïétiques, comme les lymphocytes T et B et les cellules des lignées myéloïdes, en particulier les lignées neutrophilique et mégacaryocytaire. Cette expression semble conservée au-delà de la transformation néoplasique de ces types cellulaires. **Ainsi, la spécificité du marquage ERG paraît légèrement inférieure à celle du marquage CD31.**

Ainsi, lors de l'observation des tumeurs vasculaires après immunomarquage avec l'anticorps anti-ERG, la présence d'amas, dans la pulpe rouge, de cellules myéloïdes au noyau moyennement marqué, a parfois légèrement compliqué l'interprétation des marquages. Or, l'activation d'une hématopoïèse extra-médullaire entraînant la prolifération de cellules hématopoïétiques dans la rate, a fréquemment été rapportée lors d'HSA canin (Bertazzolo *et al.*, 2005) et est également signalée chez la souris lors de l'induction chimique d'HSA (Criswell *et al.*, 2012). Cette difficulté est donc susceptible d'être fréquente, mais peu problématique à condition que l'observateur en soit conscient et interprète le marquage en conséquence.

Ce défaut de spécificité, avec un marquage qui n'est pas strictement limitée aux cellules endothéliales, pourrait en théorie poser problème dans quelques autres cas particuliers. Par exemple, imaginons une tumeur splénique se présentant dans la pulpe rouge, sous la forme de plages de cellules rondes de grande taille, fortement nucléolées, à chromatine fine, très mitotiques. Un marquage ERG positif de ces cellules pourrait alors être interprété soit comme un HSA peu différencié, d'autant plus si les plages de cellules tumorales sont infiltrées par des hématies libres, soit comme une leucémie myéloblastique. Normalement, un examen minutieux d'une lame colorée en HE devrait déjà permettre de trancher entre ces deux hypothèses. Néanmoins, en cas de doute persistant, le recours à un second marqueur endothélial comme le CD31 aiderait à l'obtention d'un diagnostic définitif.

Malgré tout, le marquage CD31 n'est pas non plus strictement limité aux cellules endothéliales. En effet, si l'on se réfère aux données publiées pour le chien, parmi les cellules présentes dans la rate, CD31 est également retrouvé dans les mégacaryocytes, les plaquettes, voire les macrophages. (Meuten, 2017) Dans notre étude, cependant, si les plaquettes étaient régulièrement CD31-positives, les mégacaryocytes et les macrophages étaient, eux, CD31-négatifs, à l'exception d'un unique cas où une fraction des mégacaryocytes est apparue marquée avec l'anticorps anti-CD31.

En outre, 98 % des tumeurs stromales testées se sont montrées ERG-négatives. Compte-tenu du fait que ce type tumoral constitue la tumeur la plus difficile à distinguer d'un HSA de morphologie atypique, ce résultat permet d'appuyer l'utilité du marquage ERG dans un contexte diagnostique.

**En pratique, lors de tumeur splénique, une positivité des cellules tumorales avec l'anticorps anti-ERG devra, si l'architecture de la tumeur et la morphologie des cellules tumorales y sont compatibles, être interprétée comme une appartenance à la population endothéliale.**

#### ❖ Complémentarité

Finalement, au cours de cette étude, les marquages ERG et CD31 ont démontré des caractéristiques complémentaires.

En effet, ces deux marqueurs brillent pour leur sensibilité envers les cellules endothéliales saines et tumorales. De plus, ERG semble plus résistant que CD31 lors de fixation non optimale du prélèvement. En revanche, le marquage CD31 était souvent conservé dans des zones d'autolyse ou de nécrose, là où ERG était absent. En outre, à chaque fois que le marquage était d'intensité faible pour l'un des deux marqueurs, l'autre marqueur se montrait toujours d'intensité moyenne à forte, permettant de combler tout doute relatif à l'origine endothéliale. Ces deux marqueurs ne sont probablement pas sensibles aux mêmes facteurs, biologiques ou techniques, pouvant affecter la technique d'immunomarquage d'une tumeur vasculaire.

De plus, les quelques défauts de spécificité de ces marqueurs pour les cellules endothéliales sont eux aussi complémentaires. Là où l'anticorps anti-ERG peut marquer, en plus des tumeurs vasculaires, des tumeurs d'origine hématopoïétique, le marquage CD31 semble, du moins chez le chien, plutôt affiné pour des tumeurs carcinomateuses (Ramos-Vara *et al.*, 2018). Il est donc peu probable qu'une tumeur qui ne soit pas d'origine endothéliale puisse exprimer à la fois ERG et CD31. Aussi, lors du diagnostic d'une tumeur, en cas de doute entre une origine endothéliale et une origine épithéliale, le marquage ERG sera préféré en première intention. À l'inverse, en cas de doute entre une origine endothéliale ou hématogène, le marquage CD31 sera plus adapté. Enfin, lors de doute entre une tumeur vasculaire et une tumeur mésenchymateuse à cellules fusiformes, ERG pourra être favorisé du fait de la facilité de lecture qu'il offre et de sa sensibilité supérieure, d'autant plus que de rares sarcomes indifférenciés ont été détectés CD31-positifs chez l'Homme (McKay *et al.*, 2012).

Un autre aspect technique intéressant est que ces deux marqueurs se montrent complémentaires si des doubles marquages doivent être réalisés. Un double marquage correspond au même procédé qu'un immunomarquage classique, mais avec incubation de deux anticorps primaires, chacun associé à un générateur de signal différent. Ceci permet la mise en évidence, sur la même coupe histologique, de deux protéines distinctes. Ce procédé, encore peu utilisé dans un contexte diagnostique, est en revanche utilisé en routine dans les projets de recherche. Les caractéristiques différentes des marqueurs ERG et CD31 rendent chacun utile dans des cas différents. Par exemple, si l'index de prolifération des cellules endothéliales était à déterminer, un marquage Ki-67, nucléaire, pourrait être associé au marquage CD31, membranaire, afin de mettre en évidence les cellules endothéliales engagées dans un processus de division. En revanche, si l'expression d'un récepteur membranaire particulier par ces cellules était investiguée, l'addition d'un marquage ERG, nucléaire, au marquage du récepteur membranaire en question serait plus adaptée.

### C. Perspectives

Certains points mis en lumière lors de ces travaux pourraient être approfondis dans des études ultérieures. Le projet présenté permet d'obtenir une bonne idée de l'immunoréactivité des cellules spléniques saines du chien à l'anticorps anti-ERG utilisé. Cependant, la réalisation d'une cartographie du marquage ERG dans d'autres organes serait intéressante pour vérifier que le marquage de ces cellules, notamment les cellules endothéliales, est uniforme dans tout l'organisme. En outre, cela permettrait d'observer le comportement de cet anticorps avec d'autres types cellulaires dont la rate est dépourvue, telles que les populations épithéliales.

Cette étude s'est limitée aux tumeurs vasculaires de la rate (organe dans lequel ces tumeurs sont fréquentes) mais l'observation du marquage d'hémangiomes et d'HSAs avec l'anticorps anti-ERG dans d'autres organes, comme la peau, pourrait réserver des surprises. Il serait donc nécessaire de s'assurer qu'il n'en est rien avant de généraliser les résultats obtenus.

De même, il serait intéressant de compléter et d'approfondir les résultats observés avec d'autres types tumoraux. La protéine ERG est par exemple présente dans les cellules tumorales d'environ la moitié des carcinomes prostatiques chez l'Homme. Le marqueur ERG est ainsi exploité comme outil diagnostique, en tant que marqueur spécifique de ces tumeurs, et comme indicateur pronostique. (Miettinen *et al.*, 2011; Dawoud *et al.*, 2021; Stephen and Badhe, 2022) Aucune étude rapportant une expression d'ERG dans des carcinomes prostatiques canins n'a été trouvée lors de la phase de préparation de ce travail. Les cancers prostatiques de l'Homme et du chien présentent des aspects physio-pathologiques distincts. Dans le carcinome prostatique humain, l'initiation du processus carcinogène dépend d'androgènes, notamment par le biais du récepteur des androgènes (AR). Ensuite, la maladie dépend de ces hormones pour une durée limitée, avant que la tumeur n'évolue en cancer prostatique résistant à la castration (CRPC). (Ryman-Tubb *et al.*, 2021) D'ailleurs, la fusion *ERG:TMPRSS2* est souvent secondaire à une exposition prolongée aux androgènes, et place ERG sous le contrôle d'un promoteur androgène-dépendant. En outre, une interrelation entre ERG et l'AR est à l'origine d'une dédifférenciation des cellules tumorales dans le cancer prostatique ERG-positif. (Adamo and Lodomery, 2016)

Il semble qu'il existe un lien entre les androgènes, ERG et l'AR dans le développement du cancer de la prostate chez l'Homme. Chez le chien, les carcinomes prostatiques sont rares, et l'influence de la castration sur leur genèse fait l'objet d'une controverse. Ces tumeurs ne semblent pas sensibles à une privation d'androgènes, par opposition aux stades initiaux des carcinomes prostatiques humains. (Schrank and Romagnoli, 2020) De plus, la perte d'AR a été rapportée dans certains carcinomes prostatiques canins. (Nascente *et al.*, 2022) Ces données suggèrent que les carcinomes prostatiques canins se rapprochent plutôt des CRPC humains, et pourraient même en servir de modèle. (Ryman-Tubb *et al.*, 2021; Nascente *et al.*, 2022) Par ailleurs, d'autres voies de signalisation ont été rapportées communes aux carcinomes prostatiques humain et canin. (Nascente *et al.*, 2022) Ainsi, il serait intéressant de réaliser des marquages ERG de carcinomes prostatiques canins, afin d'étudier l'expression du gène ERG dans ceux-ci et la comparer aux données disponibles chez l'Homme, afin d'obtenir un nouvel élément de comparaison entre ces deux maladies.

Le marquage ERG positif des deux mastocytomes de l'étude est surprenant. Il serait intéressant d'approfondir ce résultat, en réalisant de nombreux marquages avec l'anticorps anti-ERG sur des tissus sains riches en mastocytes, comme la peau ou l'intestin, et sur des mastocytomes cutanés. Ceci permettrait, premièrement, d'observer la réactivité des mastocytes sains à l'anticorps anti-ERG, et deuxièmement, d'avoir une idée de la fréquence des mastocytomes ERG-positifs, voire d'explorer la possibilité d'utiliser le marquage ERG comme facteur pronostic.

Enfin, au vu du marquage des lymphocytes et des lymphomes observés, qui semble indépendant de l'immunophénotype T ou B des cellules, l'étude plus précise de l'expression du facteur de transcription ERG en fonction du type de lymphome et de son territoire d'origine serait pertinente. Par exemple, il pourrait être intéressant de réaliser un typage plus précis des deux cas de l'étude, et d'étendre l'étude du marquage ERG à plus de lymphomes spléniques et à des lymphomes d'autres origines. Ceci permettrait d'explorer une éventuelle corrélation entre l'intensité du marquage ERG et le type de lymphome étudié.



# CONCLUSION

Les tumeurs vasculaires spléniques sont fréquentes chez le chien, et associées à un mauvais pronostic. L'optimisation de leur prise en charge dépend de l'obtention d'un diagnostic fiable, pour lequel la méthode de référence est l'examen histologique de la tumeur après son exérèse. Cependant, cet examen peut dans certain cas s'avérer difficile en raison de convergences architecturales et morphologiques entre plusieurs types tumoraux, et/ou en raison du caractère peu différencié de la tumeur analysée. Dans ce cas, le recours à des immunomarquages permettant de prouver l'origine endothéliale des cellules tumorales est nécessaire.

En histopathologie vétérinaire, trois marqueurs de l'endothélium des vaisseaux sanguins sont actuellement disponibles. Le marqueur qui présente le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité est le CD31. Cependant, quelques tumeurs d'origine autre que vasculaire peuvent être CD31-positives.

Mon travail de thèse avait pour objet de valider chez le chien un nouveau marqueur des cellules endothéliales, très utilisé chez l'Homme : le facteur de transcription ERG.

Il n'existe aucun anticorps spécifique de la protéine ERG canine. Cependant une étape préliminaire de nos travaux a permis de montrer par bioinformatique une très forte homologie entre les protéines ERG canine et humaine. Cette information nous a raisonnablement permis d'espérer qu'un anticorps anti-ERG développé contre la protéine humaine puisse présenter une réaction croisée avec la protéine canine. En conséquence, nous avons sélectionné le clone EP111, largement utilisé comme marqueur d'ERG dans les laboratoires d'histopathologie humaine, pour la suite des expérimentations.

Bien que prévu, un Western Blot sur des cellules endothéliales canines n'a pas pu être mené à bien dans les temps. Néanmoins, une étude immunohistochimique a été réalisée sur 200 tumeurs spléniques de chien, dont 65 tumeurs diagnostiquées comme des tumeurs vasculaires sur la base d'un examen histopathologique standard.

Les résultats obtenus montrent que ce clone permet d'identifier les tumeurs vasculaires avec une très grande sensibilité et un grand confort de lecture, meilleurs que lors de l'utilisation d'un anticorps anti-CD31 avec lequel nous l'avons comparé. En outre, l'absence de marquage sur 98 % des tumeurs stromales spléniques testées indique la très bonne spécificité de cet anticorps anti-ERG. Cependant, le marquage par ce clone de cellules hématopoïétiques saines et tumorales, qui semblent également exprimer la protéine ERG, peut parfois poser des difficultés dans l'interprétation des marquages obtenus.

En conclusion, l'utilisation d'un anticorps anti-ERG dans le cadre du diagnostic histopathologique des tumeurs vasculaires spléniques du chien apporte une plus-value par rapport aux marqueurs déjà disponibles en médecine vétérinaire, notamment CD31. Ceci n'empêche pas, dans certaines circonstances particulières dans lesquelles les cellules tumorales ERG-positives présentent une morphologie et une organisation architecturale inhabituelle pour une tumeur vasculaire, d'utiliser un marqueur complémentaire comme le CD31.



# BIBLIOGRAPHIE

- ABCAM (2019) *Immunohistochemistry Application Guide* [en ligne]. Disponible sur : <https://www.abcam.com/kits/introduction-to-immunohistochemistry-ihc> [Consulté le 27 février 2023].
- Adachi, M., Hoshino, Y., Izumi, Y., Takagi, S. (2016) ‘Immunohistochemical detection of a potential molecular therapeutic target for canine hemangiosarcoma’ [en ligne], *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(4), pp. 649–656. Disponible sur : <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0625> [Consulté le 2 novembre 2021].
- Adamo, P. and Lodomery, M.R. (2016) ‘The oncogene ERG: a key factor in prostate cancer’ [en ligne], *Oncogene*, 35(4), pp. 403–414. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/onc.2015.109> [Consulté le 29 mars 2023].
- Alexander, C.K., Cronin, K.L., Silver, M., Gardner, H.L., London, C. (2019) ‘The addition of metronomic chemotherapy does not improve outcome for canine splenic haemangiosarcoma: Adjuvant metronomic chemotherapy for dogs with splenic haemangiosarcoma’ [en ligne], *Journal of Small Animal Practice*, 60(1), pp. 32–37. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/jsap.12926> [Consulté le 1er octobre 2022].
- Andersen, N.J. *et al.* (2013) ‘Pharmacologic inhibition of MEK signaling prevents growth of canine hemangiosarcoma’ [en ligne], *Molecular cancer therapeutics*, 12(9), pp. 1701–1714. Disponible sur : <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0893> [Consulté le 21 février 2023].
- Bacha, W.J. and Bacha, L.M. (2012) *Color atlas of veterinary histology. 3rd edition*. Ames : Wiley-Blackwell, 342 p.
- Barone, R. (2009) *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 3 : Splanchnologie I*. 4ème édition. Paris : Vigot, 853 p.
- Beerlage, C. *et al.* (2012) ‘Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii and Bartonella henselae as potential causes of proliferative vascular diseases in animals’ [en ligne], *Medical Microbiology and Immunology*, 201(3), pp. 319–326. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s00430-012-0234-5> [Consulté le 5 novembre 2021].
- Bertazzolo, W. *et al.* (2005) ‘Canine angiosarcoma: cytologic, histologic, and immunohistochemical correlations’ [en ligne], *Veterinary Clinical Pathology*, 34(1), pp. 28–34. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00005.x> [Consulté le 24 octobre 2022].
- Birdsey, G.M. *et al.* (2008) ‘Transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin’ [en ligne], *Blood*, 111(7), pp. 3498–3506. Disponible sur : <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-105346> [Consulté le 29 octobre 2022].
- Birdsey, G.M. *et al.* (2012) ‘The transcription factor Erg regulates expression of histone deacetylase 6 and multiple pathways involved in endothelial cell migration and angiogenesis’ [en ligne], *Blood*, 119(3), pp. 894–903. Disponible sur : <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-350025> [Consulté le 29 octobre 2022].
- Birdsey, G.M. *et al.* (2015) ‘The Endothelial Transcription Factor ERG Promotes Vascular Stability and Growth through Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling’ [en ligne], *Developmental Cell*, 32(1), pp. 82–96. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.016> [Consulté le 28 octobre 2022].
- Borgatti, A. *et al.* (2017) ‘Safe and Effective Sarcoma Therapy through Bispecific Targeting of EGFR and uPAR’ [en ligne], *Molecular cancer therapeutics*, 16(5), pp. 956–965. Disponible sur : <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0637> [Consulté le 15 février 2023].

- Boston, S.E., Higginson, G., Monteith, G. (2011) ‘Concurrent Splenic and Right Atrial Mass at Presentation in Dogs with HSA: A Retrospective Study’ [en ligne], *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47(5), pp. 336–341. Disponible sur : <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5603> [Consulté le 27 mars 2023].
- Carrère, S. Verger, A., Flourens, A., Stehelin, D., Duterque-Coquillaud, M. (1998) ‘Erg proteins, transcription factors of the Ets family, form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains’ [en ligne], *Oncogene*, 16(25), pp. 3261–3268. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201868> [Consulté le 12 avril 2023].
- Chaikin, P. and Welihozkiy, A. (2018) ‘Hemangiosarcoma in a Dog: Unusual Presentation and Increased Survival Using a Complementary/Holistic Approach Combined with Metronomic Chemotherapy’ [en ligne], *Case Reports in Veterinary Medicine*, 2018, pp. 1–6. Disponible sur : <https://doi.org/10.1155/2018/6160980> [Consulté le 4 novembre 2021].
- Chen, Y.-C., Liao, J.W., Hsu, W.L., Chang, S.C. (2016) ‘Identification of the two KIT isoforms and their expression status in canine hemangiosarcomas’ [en ligne], *BMC Veterinary Research*, 12(1), p. 142. Disponible sur : <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0772-y> [Consulté le 22 février 2023].
- Childs, G.V., ‘History of Immunohistochemistry’. In McManus, L.M. and Mitchell, R.N. (dir.) (2014) *Pathobiology of Human Disease* [en ligne]. San Diego: Academic Press, pp. 3775–3796. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.07401-3> [Consulté le 13 avril 2023].
- Clifford, C.A. *et al.* (2001) ‘Plasma Vascular Endothelial Growth Factor Concentrations in Healthy Dogs and Dogs with Hemangiosarcoma’ [en ligne], *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(2), pp. 131–135. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2001.tb01244.x> [Consulté le 27 mars 2023].
- Clifford, C.A., Mackin, A.J., Henry, C.J. (2000) ‘Treatment of Canine Hemangiosarcoma: 2000 and Beyond’ [en ligne], *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14(5), pp. 479–485. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2000.tb02262.x> [Consulté le 30 septembre 2022].
- Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux. (2000) *Les indispensables de l’animal de compagnie. Cancérologie. Techniques diagnostiques en cancérologie des carnivores domestiques*. Paris: PMCAC Editions, 175 p.
- Couto, G. and Moreno, N. (2014) *Guide pratique d’oncologie canine et féline*. Paris: Éditions Med’com 200 p.
- Criswell, K.A. *et al.* (2012) ‘Key Components of the Mode of Action for Hemangiosarcoma Induction in Pregabalin-Treated Mice: Evidence of Increased Bicarbonate, Dysregulated Erythropoiesis, Macrophage Activation, and Increased Angiogenic Growth Factors in Mice but Not in Rats’, *Toxicological Sciences*, 128(1), pp. 22–41.
- Cruz Cardona, J. *et al.* ‘The Spleen’. In Valenciano A.C, Cowell, R.L. (dir.) (2020) *Cowell and Tyler’s Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*. St. Louis : Elsevier, pp. 346–362.
- Dahl, K., Gamlem, H., Tverdal, A. Glatte, E., Moe, L. (2008) ‘Canine vascular neoplasia - a population-based study of prognosis’ [en ligne], *APMIS*, 116, pp. 55–62. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2008.125m5.x> [Consulté le 27 septembre 2022].
- Dao, M., MacDonald, I., Asaro, R.J. (2021) ‘Erythrocyte flow through the interendothelial slits of the splenic venous sinus’ [en ligne], *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, 20(6), pp. 2227–2245. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s10237-021-01503-y> [Consulté le 23 mars 2023].
- Davies, O. and Taylor, A.J. (2020) ‘Refining the “double two-thirds” rule: Genotype-based breed grouping and clinical presentation help predict the diagnosis of canine splenic mass lesions in 288 dogs’, *Veterinary and Comparative Oncology*, 18(4), pp. 548–558.

- Dawoud, M.M., Aiad, H.A.-S., BahBah, A.M., Shaban, M.I. (2021) 'Comparative study of immunohistochemical expression of ERG and MAGI2 in prostatic carcinoma' [en ligne], *Annals of Diagnostic Pathology*, 52, p. 151727. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2021.151727> [Consulté le 2 mai 2023].
- Day, M.J., Lucke, V.M., Pearson, H. (1995) 'A review of Pathological diagnoses made from 87 canine splenic biopsies' [en ligne], *Journal of Small Animal Practice*, 36(10), pp. 426–433. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1995.tb02769.x> [Consulté le 5 novembre 2021].
- De Young, B.R., Frierson, H.F.Jr., Ly, M.N., Smith, D., Swanson, P.E. (1998) 'CD31 Immunoreactivity in Carcinomas and Mesotheliomas' [en ligne], *American Journal of Clinical Pathology*, 110(3), pp. 374–377. Disponible sur : <https://doi.org/10.1093/ajcp/110.3.374> [Consulté le 27 avril 2023].
- Dobson, J.M. 'Tumours of the spleen'. In Dobson, J.M. and Lascelles, B.D.X. (dir.) (2011) *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*. British Small Animal Veterinary Association, pp. 304–308.
- Dobson, J.M. (2013) 'Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs' [en ligne], *ISRN Veterinary Science*, 2013, p. 941275. Disponible sur : <https://doi.org/10.1155/2013/941275> [Consulté le 21 février 2023].
- Donczo, B. and Guttman, A. (2018) 'Biomedical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples: The Holy Grail for molecular diagnostics' [en ligne], *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 155, pp. 125–134. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.065> [Consulté le 20 mars 2023].
- Durer, S. and Shaikh, H. (2022) *Ewing Sarcoma*, *StatPearls* [en ligne]. StatPearls Publishing. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559183/> [Consulté le 11 avril 2023].
- Dyer, C.D.S. and Jennings, S.H. (2016) 'Pathology in Practice', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 249(11), pp. 1263–1265.
- Faulhaber, E.A., Janik, E., Thamm, D.H. (2021) 'Adjuvant carboplatin for treatment of splenic hemangiosarcoma in dogs: Retrospective evaluation of 18 cases (2011-2016) and comparison with doxorubicin-based chemotherapy', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 35, pp. 1929–1934.
- Ferrer, L., Fondevila, D., Rabanal, R.M., Vilafranca, M. (1995) 'Immunohistochemical Detection of CD31 Antigen in Normal and Neoplastic Canine Endothelial Cells', *Journal of Comparative Pathology*, 112, pp. 319–326.
- Fukumoto, S. *et al.* (2015) 'Big endothelin-1 as a tumour marker for canine haemangiosarcoma' [en ligne], *The Veterinary Journal*, 204(3), pp. 269–274. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.03.024> [Consulté le 27 mars 2023].
- Fukunaga, M. (2005) 'Expression of D2-40 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumours' [en ligne], *Histopathology*, 46(4), pp. 396–402. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02098.x> [Consulté le 27 février 2023].
- Gamlem, H. and Nordstoga, K. (2008) 'Canine vascular neoplasia - histologic classification and immunohistochemical analysis of 221 tumours and tumour-like lesions' [en ligne], *APMIS*, 116, pp. 19–40. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2008.125m3.x> [Consulté le 10 novembre 2021].
- Gardner, H.L. *et al.* (2015) 'Maintenance therapy with toceranib following doxorubicin-based chemotherapy for canine splenic hemangiosarcoma' [en ligne], *BMC Veterinary Research*, 11, p. 131. Disponible sur : <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0446-1> [Consulté le 15 février 2023].
- Gázquez, A. *et al.* (2012) 'Widespread epithelioid angiosarcoma with ventricular wall involvement in a dog' [en ligne], *Histology and Histopathology*, (27), pp. 865–872. Disponible sur : <https://doi.org/10.14670/HH-27.865> [Consulté le 14 février 2023].

- GE Healthcare Life Sciences (2011) *Western Blotting: Principles and Methods*. Uppsala : GE Healthcare Bio-Sciences AB, 176 p.
- Ginsberg, J.P. *et al.* (1999) ‘EWS-FLI1 and EWS-ERG Gene Fusions Are Associated With Similar Clinical Phenotypes in Ewing’s Sarcoma’ [en ligne], *Journal of Clinical Oncology*, 17(6), pp. 1809–1809. Disponible sur : <https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.6.1809> [Consulté le 11 avril 2023].
- Gorden, B.H. *et al.* (2014) ‘Identification of Three Molecular and Functional Subtypes in Canine Hemangiosarcoma through Gene Expression Profiling and Progenitor Cell Characterization’ [en ligne], *The American Journal of Pathology*, 184(4), pp. 985–995. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.12.025> [Consulté le 17 février 2023].
- Görizt, M. *et al.* (2013) ‘Canine Splenic Haemangiosarcoma: Influence of Metastases, Chemotherapy and Growth Pattern on Post-splenectomy Survival and Expression of Angiogenic Factors’ [en ligne], *Journal of Comparative Pathology*, 149(1), pp. 30–39. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.11.234> [Consulté le 9 novembre 2021].
- Gouallec, M. (2005) *Etude bibliographique des tumeurs spléniques du chien*. Thèse de doctorat vétérinaire. Lyon : Université Claude Bernard Lyon 1, 192 p.
- Griffin, M.A., Culp, W.T.N., Rebhun, R.B. (2021) ‘Canine and feline haemangiosarcoma’, *Veterinary Record*, 189(9).
- Grüntzig, K. *et al.* (2016) ‘Swiss Canine Cancer Registry 1955–2008: Occurrence of the Most Common Tumour Diagnoses and Influence of Age, Breed, Body Size, Sex and Neutering Status on Tumour Development’ [en ligne], *Journal of Comparative Pathology*, 155(2–3), pp. 156–170. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.05.011> [Consulté le 28 septembre 2022].
- Haber, M.A. *et al.* (2015) ‘ERG is a novel and reliable marker for endothelial cells in central nervous system tumors’ [en ligne], *Clinical Neuropathology*, 34(05), pp. 117–127. Disponible sur : <https://doi.org/10.5414/NP300817> [Consulté le 14 juin 2022].
- Halsey, C.H.C., Worley, D.R., Curran, K., Charles, J.B., Ehrhart, E.J. (2016) ‘The use of novel lymphatic endothelial cell-specific immunohistochemical markers to differentiate cutaneous angiosarcomas in dogs’ [en ligne], *Veterinary and Comparative Oncology*, 14(3), pp. 236–244. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/vco.12088> [Consulté le 20 avril 2023].
- Hammer, A.S., Couto, C.G., Filppi, J., Getzy, D., Shank, K. (1991) ‘Efficacy and Toxicity of VAC Chemotherapy (Vincristine, Doxorubicin, and Cyclophosphamide) in Dogs with Hemangiosarcoma’ [en ligne], *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 5(3), pp. 160–166. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1991.tb00943.x> [Consulté le 15 novembre 2021].
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) ‘Hallmarks of Cancer: The Next Generation’ [en ligne], *Cell*, 144(5), pp. 646–674. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013> [Consulté le 21 avril 2023].
- Harvey, J.W. (2012) *Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas*. St. Louis, Missouri : Elsevier/Saunders, 360 p.
- He, J. *et al.* (2015) ‘Analytical platform evaluation for quantification of ERG in prostate cancer using protein and mRNA detection methods’ [en ligne], *Journal of Translational Medicine*, 13, p. 54. Disponible sur : <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0418-z> [Consulté le 13 avril 2023].
- Hirsch, V.M., Jacobsen, J., Mills, J.H.L. (1981) ‘A retrospective study of canine hemangiosarcoma and its association with acanthocytosis’, *Canadian Veterinary Journal*, 22, pp. 152–155.
- Hoesel, B. *et al.* (2016) ‘Sequence-function correlations and dynamics of ERG isoforms. ERG8 is the black sheep of the family’ [en ligne], *Biochimica et biophysica acta*, 1863(2), pp. 205–218. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.10.023> [Consulté le 12 avril 2023].

- Hornick, J.L. (2014) 'Novel uses of immunohistochemistry in the diagnosis and classification of soft tissue tumors' [en ligne], *Modern Pathology*, 27, pp. S47–S63. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.177> [Consulté le 27 février 2023].
- Jennings, R. *et al.* (2017) *Veterinary Histology*. Colombus : The Ohio State University, 254 p.
- Jennings, R.N., Miller, M.A., Ramos-Vara, J.A. (2012) 'Comparison of CD34, CD31, and Factor VIII–Related Antigen Immunohistochemical Expression in Feline Vascular Neoplasms and CD34 Expression in Feline Nonvascular Neoplasms' [en ligne], *Veterinary Pathology*, 49(3), pp. 532–537. Disponible sur : <https://doi.org/10.1177/0300985811429312> [Consulté le 10 novembre 2021].
- Johnson, K.A. *et al.* (1989) 'Splénomégaly in dogs : Predictors of neoplasia and survival after splenectomy', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 3(3), pp. 160–166.
- Johnston, S.A. and Tobias, K.M. (2018) *Veterinary surgery : Small animal*. Second edition. St. Louis, Missouri : Elsevier, 1397 p.
- Kakiuchi-Kiyota, S. *et al.* (2020) 'Expression of Hematopoietic Stem and Endothelial Cell Markers in Canine Hemangiosarcoma' [en ligne], *Toxicologic Pathology*, 48(3), pp. 481–493. Disponible sur : <https://doi.org/10.1177/0192623319897539> [Consulté le 6 novembre 2022].
- Kent, M.S., Burton, J.H., Dank, G., Bannasch, D.L., Rebhun, R.B. (2018) 'Association of cancer-related mortality, age and gonadectomy in golden retriever dogs at a veterinary academic center (1989-2016)' [en ligne], *PLOS ONE*. Edited by J.A. Bauer, 13(2), p. e0192578. Disponible sur : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192578> [Consulté le 5 octobre 2022].
- Khosh Kish, E. *et al.* (2022) 'The Expression of Proto-Oncogene ETS-Related Gene (ERG) Plays a Central Role in the Oncogenic Mechanism Involved in the Development and Progression of Prostate Cancer' [en ligne], *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), p. 4772. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/ijms23094772> [Consulté le 29 mars 2023].
- Kiehl, A.R. and Calderwood Mays, M.B. (2016) *Atlas for the diagnosis of tumors in the dog and cat*. Ames, Iowa, USA : Wiley Blackwell, 232 p.
- Kim, E.K. and Choi, E.-J. (2010) 'Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases' [en ligne], *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1802(4), pp. 396–405. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009> [Consulté le 22 février 2023].
- Kim, J.H., Graef, A.J, Dickerson, E.B., Modiano, J.F. (2015) 'Pathobiology of Hemangiosarcoma in Dogs: Research Advances and Future Perspectives', *Veterinary Sciences*, 2(4), pp. 388–405.
- Kim, J.H. *et al.* (2021) 'Genomically Complex Human Angiosarcoma and Canine Hemangiosarcoma Establish Convergent Angiogenic Transcriptional Programs Driven by Novel Gene Fusions', *Molecular cancer research : MCR*, 19(5), pp. 847–861.
- Kim, S. *et al.* (2013) 'ERG Immunohistochemistry as an Endothelial Marker for Assessing Lymphovascular Invasion' [en ligne], *Korean Journal of Pathology*, 47(4), p. 355. Disponible sur : <https://doi.org/10.4132/KoreanJPathol.2013.47.4.355> [Consulté le 5 novembre 2022].
- Konduri, V. *et al.* (2019) 'Dendritic cell vaccination plus low-dose doxorubicin for the treatment of spontaneous canine hemangiosarcoma', *Cancer Gene Therapy*, 26(9), pp. 282–291.
- König, H.E. and Liebich, H.-G. (2020) *Veterinary anatomy of domestic animals textbook and colour atlas*. 7th edition. New York : Thieme, 864 p.
- Kumar, M.S.A. (2015) *Clinically oriented anatomy of the dog & cat*. Second edition. Ronkonkoma, NY : Linus Learning, 1380 p.

- Lamerato-Kozicki, A.R., Helm, K.M., Jubala, C.M., Cutter, G.C., Modiano, J.F. (2006) ‘Canine hemangiosarcoma originates from hematopoietic precursors with potential for endothelial differentiation’ [en ligne], *Experimental Hematology*, 34(7), pp. 870–878. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.04.013> [Consulté le 17 février 2023].
- Lana, S. *et al.* (2007) ‘Continuous Low-Dose Oral Chemotherapy for Adjuvant Therapy of Splenic Hemangiosarcoma in Dogs’, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(4), pp. 764–769.
- Langeeggen, H., Pausa, M., Johnson, E., Casarsa, C., Tedesco, F. (2001) ‘The endothelium is an extrahepatic site of synthesis of the seventh component of the complement system’ [en ligne], *Clinical and Experimental Immunology*, 121(1), pp. 69–76. Disponible sur : <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01238.x> [Consulté le 7 novembre 2022].
- Laprie, C., Abadie, j., Amardeilh, M.F., Raymond, I., Delverdier, M. (1998) ‘Detection of the Ki-67 Proliferation Associated Nuclear Epitope in Normal Canine Tissues Using the Monoclonal Antibody MIB-1’ [en ligne], *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 27(4), pp. 251–256. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1998.tb00189.x> [Consulté le 13 avril 2023].
- Lashnits, E. *et al.* (2020) ‘Molecular prevalence of Bartonella, Babesia, and hemotropic Mycoplasma species in dogs with hemangiosarcoma from across the United States’ [en ligne], *PLOS ONE*, 15(1). Disponible sur : <https://doi.org/10.1371> [Consulté le 3 novembre 2021].
- Lewis, S.M., Williams, A., Eisenbarth, S.C. (2019) ‘Structure-function of the immune system in the spleen’ [en ligne], *Science immunology*, 4(33), p. eaau6085. Disponible sur : <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau6085> [Consulté le 23 mars 2023].
- Li, Y., Luo, H., Liu, T., Zacksenhaus, E., Ben-Davis, Y. (2015) ‘The ets transcription factor Fli-1 in development, cancer and disease’, *Oncogene*, 34(16), pp. 2022–2031.
- Lin, F. and Chen, Z. (2014) ‘Standardization of Diagnostic Immunohistochemistry: Literature Review and Geisinger Experience’ [en ligne], *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 138(12), pp. 1564–1577. Disponible sur : <https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0074-RA> [Consulté le 27 février 2023].
- Lorenzin, F. and Demichelis, F. (2022) ‘Past, Current, and Future Strategies to Target ERG Fusion-Positive Prostate Cancer’, *Cancers*, 14(5), p. 1118.
- Loreto, C. and Caltabiano, R. (2021) ‘Immunohistochemical Expression’ [en ligne], *Applied Sciences*, 11(1), p. 360. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/app11010360> [Consulté le 27 février 2023].
- Lucroy, M.D., Clauson, R.M., Suckow, M.A., El-Tayyeb, F., Kalinauskas, A. (2020) ‘Evaluation of an autologous cancer vaccine for the treatment of metastatic canine hemangiosarcoma: a preliminary study’ [en ligne], *BMC Veterinary Research*, 16. Disponible sur : <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02675-y> [Consulté le 15 février 2023].
- Machado, I. *et al.* (2021) ‘Angiosarcomas: histology, immunohistochemistry and molecular insights with implications for differential diagnosis’ [en ligne], *Histology and Histopathology*, 36(1), pp. 3–18. Disponible sur : <https://doi.org/10.14670/HH-18-246> [Consulté le 5 novembre 2022].
- Maeda, M. *et al.* (2022) ‘In vitro anticancer effects of alpelisib against PIK3CA-mutated canine hemangiosarcoma cell lines’, *Oncology Reports*, 47(4), p. 84.
- Magaki, S., Hojat, S.A., Wei, B., So, A., Yong, W.H. (2019) ‘An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry’ [en ligne], *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1897, pp. 289–298. Disponible sur : [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25) [Consulté le 27 février 2023].
- Magnol, J.-P. *et al.* (1998) *Cancérologie clinique du chien*. Saint-Pierre-la-Palud, 426 p.
- Maharani, A. *et al.* (2018) ‘Cellular atypia is negatively correlated with immunohistochemical reactivity of CD31 and vWF expression levels in canine hemangiosarcoma’, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 80(2), pp. 213–218.

- Martens, J.H.A. (2011) ‘Acute myeloid leukemia: A central role for the ETS factor ERG’ [en ligne], *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(10), pp. 1413–1416. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.05.014> [Consulté le 11 avril 2023].
- Masyr, A.R., Rendahl A.K., Winter, A.L., Borgatti, A., Modiano, J.F. (2021) ‘Retrospective evaluation of thrombocytopenia and tumor stage as prognostic indicators in dogs with splenic hemangiosarcoma’, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 258(6), pp. 630–637.
- Matsuyama, A., Poirier, V.J., Mantovani, F., Foster, R.A., Mutsaers, A.J. (2017) ‘Adjuvant Doxorubicin with or without Metronomic Cyclophosphamide for Canine Splenic Hemangiosarcoma’, *Journal of the American Animal Hospital Association*, 53(6), pp. 304–312.
- Mattoon, J.S. and Duffy, M. ‘10. Spleen’. In Nyland, T.G., Mattoon, J.S. (Dir.) (2002), *Small Animal Diagnostic Ultrasound*. 2nd edition. Philadelphia : Saunders, 461 p.
- McKay, K.M., Doyle, L.A., Lazar, A.J., Hornick, J.L. (2012) ‘Expression of ERG, an Ets family transcription factor, distinguishes cutaneous angiosarcoma from histological mimics. *Histopathology*, 61(5), pp. 989–991.
- McMillan, D.B. and Harris, R.J. (2018) ‘Hemopoietic Organs’. In McMillan, D.B. and Harris, R.J. (Dir.) (2018). *An Atlas of Comparative Vertebrate Histology*. St. Louis, Missouri : Elsevier, pp. 227–256.
- Megquier, K. *et al.* (2019) ‘Comparative genomics reveals shared mutational landscape in canine hemangiosarcoma and human angiosarcoma’, *Molecular cancer research : MCR*, 17(12), pp. 2410–2421.
- Meuten, D.J. (2017) *Tumors in domestic animals*. Fifth edition. Ames, Iowa : Wiley/Blackwell, 989 p.
- Miettinen, M. (2014) ‘Immunohistochemistry of soft tissue tumours - review with emphasis on 10 markers’ [en ligne] , *Histopathology*, 64(1), pp. 101–118. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/his.12298> [Consulté le 25 octobre 2022].
- Miettinen, M., Lindenmayer, A.E., Chaubal, A. (1994) ‘Endothelial cell markers CD31, CD34, and BNH9 antibody to H- and Y-antigens--evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor’, *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 7(1), pp. 82–90.
- Miettinen, M. *et al.* (2011) ‘ERG Transcription Factor as an Immunohistochemical Marker for Vascular Endothelial Tumors and Prostatic Carcinoma’ [en ligne], *American Journal of Surgical Pathology*, 35(3), pp. 432–441. Disponible sur : <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318206b67b> [Consulté le 15 mai 2021].
- Miettinen, M., Wang, Z., Sarlomo-Rikala, M., Abdullaev, Z., Pack, S.D., Fetsch, J.F. (2013) ‘ERG Expression in Epithelioid Sarcoma: A Diagnostic Pitfall’ [en ligne], *American Journal of Surgical Pathology*, 37(10), pp. 1580–1585. Disponible sur : <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31828de23a> [Consulté le 6 novembre 2022].
- Minner, S. *et al.* (2013) ‘Marked heterogeneity of ERG expression in large primary prostate cancers’, *Modern Pathology*, 26(1), pp. 106–116.
- Moore, A.S. and Frimberger, A.E. (2010) *Oncology for veterinary technicians and nurses*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 318 p.
- Mukai, C. *et al.* (2020) ‘Chromatin run-on sequencing analysis finds that ECM remodeling plays an important role in canine hemangiosarcoma pathogenesis’ [en ligne], *BMC Veterinary Research*, 16(1), p. 206. Disponible sur : <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02395-3> [Consulté le 22 février 2023].
- Mullin, C. and Clifford, C.A. (2019) ‘Histiocytic Sarcoma and Hemangiosarcoma Update’ [en ligne], *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 49(5), pp. 855–879. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.04.009> [Consulté le 15 février 2023].

- Murai, A. *et al.* (2012) ‘Immunohistochemical Analysis of the Akt/mTOR/4E-BP1 Signalling Pathway in Canine Haemangiomas and Haemangiosarcomas’ [en ligne], *Journal of Comparative Pathology*, 147(4), pp. 430–440. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.05.002> [Consulté le 21/02/23].
- Musser, M.L., Coto, G.M., Lingnan, Y., Mochel, J.P., Johannes, C.M. (2022) ‘Pilot safety evaluation of doxorubicin chemotherapy combined with non-specific immunotherapy (Immunocidin®) for canine splenic hemangiosarcoma’ [en ligne], *PLOS ONE*, 17(12), p. e0279594. Disponible sur : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279594> [Consulté le 15 février 2023].
- Nascente, E. de P., Amorim, R.L., Fonseca-Alves, C.E., de Moura, V.M. (2022) ‘Comparative Pathobiology of Canine and Human Prostate Cancer: State of the Art and Future Directions’, *Cancers*, 14(11), p. 2727.
- Nikolova-Krstevski, V. *et al.* (2009) ‘ERG is required for the differentiation of embryonic stem cells along the endothelial lineage’ [en ligne], *BMC Developmental Biology*, 9(1), p. 72. Disponible sur : <https://doi.org/10.1186/1471-213X-9-72> [Consulté le 29 octobre 2022].
- Noroy, B. (2003) *Les conséquences de la splénectomie totale chez le chien*. Thèse de doctorat vétérinaire. Lyon : Université Claude Bernard, 92 p.
- Ogilvie, G.K., Powers, B.E., Mallinckrodt, C.H., Withrow, S.J. (1996) ‘Surgery and Doxorubicin in Dogs With Hemangiosarcoma’, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 10(6), pp. 379–384.
- Oksanen, A. (1978) ‘Haemangiosarcoma in dogs’, *Journal of Comparative Pathology*, 88(4), pp. 585–595.
- Oungsakul, P. *et al.* (2021) ‘Candidate Glycoprotein Biomarkers for Canine Visceral Hemangiosarcoma and Validation Using Semi-Quantitative Lectin/Immunohistochemical Assays’ [en ligne], *Veterinary Sciences*, 8(3), p. 38. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/vetsci8030038> [Consulté le 05/11/2022].
- Packer, D. (2021) ‘The history of the antibody as a tool’ [en ligne], *Acta Histochemica*, 123(4), p. 151710. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151710> [Consulté le 13 avril 2023].
- Park, K. *et al.* (2010) ‘Antibody-Based Detection of ERG Rearrangement-Positive Prostate Cancer’, *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 12(7), pp. 590–598.
- Pinello, K. *et al.* (2022) ‘Cross Species Analysis and Comparison of Tumors in Dogs and Cats, by Age, Sex, Topography and Main Morphologies. Data from Vet-OncoNet’ [en ligne], *Veterinary Sciences*, 9(4), p. 167. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/vetsci9040167> [Consulté le 10 février 2023].
- Pusztaszeri, M.P., Seelentag, W., Bosman, F.T. (2006) ‘Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues’ [en ligne], *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 54(4), pp. 385–395. Disponible sur : <https://doi.org/10.1369/jhc.4A6514.2005> [Consulté le 28 mars 2023].
- Ramírez, G.A., Sánchez-Salguero, X., Molín, J. (2020) ‘Primary Cystic Lymphangioma of the Spleen in an Adult Dog’ [en ligne], *Journal of Comparative Pathology*, 178, pp. 22–26. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2020.06.006> [Consulté le 27 avril 2023].
- Ramos-Vara, J.A., Miller, M.A., Dusold, D.M. (2018) ‘Immunohistochemical Expression of CD31 (PECAM-1) in Nonendothelial Tumors of Dogs’ [en ligne], *Veterinary Pathology*, 55(3), pp. 402–408. Disponible sur : <https://doi.org/10.1177/0300985817751217> [Consulté le 26 octobre 2022].
- Ranchère, D. and Coindre, J.-M. (2015) *Recommandations pour les indications d’Immunohistochimie dans les tumeurs conjonctives des tissus mous et des viscères*. Réseau RRePS, 8 p.
- Rannou, B. (2013) ‘Métabolisme du fer : Transferrine et ferritine’, *PratiqueVet*, (104), pp. 46–49.
- Rebar, A.H., Hahn, F.F., Halliwell, W.H., DeNicola, D.B., Benjamin, S.A. (1980) ‘Microangiopathic Hemolytic Anemia Associated with Radiation-Induced Hemangiosarcomas’, *Veterinary Pathology*, 17(4), pp. 443–454.

- Reece, W.O. and Rowe, E.W. (2017) *Functional anatomy and physiology of domestic animals*. Fifth edition. Hoboken, NJ: Wiley Blackwell, 551 p.
- Robinson, W.F. and Robinson, N.A. 'Cardiovascular System' [en ligne]. In Grant Maxie, M. (2016), *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 3*. St Louis : Elsevier, pp. 1-101.e1. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5319-1.00012-8> [Consulté le 15 octobre 2021].
- Ryman-Tubb, T. *et al.* (2021) 'Comparative pathology of dog and human prostate cancer' [en ligne], *Veterinary Medicine and Science*, 8(1), pp. 110–120. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/vms3.642> [Consulté le 2 mai 2023].
- Sabattini, S. and Bettini, G. (2009) 'An Immunohistochemical Analysis of Canine Haemangioma and Haemangiosarcoma' [en ligne], *Journal of Comparative Pathology*, 140(2–3), pp. 158–168. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2008.10.006> [Consulté le 4 novembre 2021].
- Salek-Ardakani, S. *et al.* (2009) 'ERG Is a Megakaryocytic Oncogene', *Cancer Research*, 69(11), pp. 4665–4673.
- Schaefer, I.-M. and Hornick, J.L. (2018) 'Diagnostic Immunohistochemistry for Soft Tissue and Bone Tumors: An Update' [en ligne], *Advances in anatomic pathology*, 25(6), pp. 400–412. Disponible sur : <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000204> [Consulté le 27 avril 2023].
- Schrank, M. and Romagnoli, S. (2020) 'Prostatic Neoplasia in the Intact and Castrated Dog: How Dangerous is Castration?' [en ligne], *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 10(1), p. 85. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/ani10010085> [Consulté le 2 mai 2023].
- Shah, A.V. *et al.* (2017) 'The endothelial transcription factor ERG mediates Angiopoietin-1-dependent control of Notch signalling and vascular stability' [en ligne], *Nature Communications*, 8(1), p. 16002. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/ncomms16002> [Consulté le 14 juin 2022].
- Shah, A.V., Birdsey, G.M., Randi, A.M. (2016) 'Regulation of endothelial homeostasis, vascular development and angiogenesis by the transcription factor ERG' [en ligne], *Vascular Pharmacology*, 86, pp. 3–13. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.05.003> [Consulté le 13 juin 2022].
- Shon, W., Folpe, A.L., Fritchie, K.J. (2015) 'ERG expression in chondrogenic bone and soft tissue tumours' [en ligne], *Journal of Clinical Pathology*, 68(2), pp. 125–129. Disponible sur : <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202601> [Consulté le 20 avril 2023].
- Shor, S., Helfand, S.C., Gorman, E., Löhr, C.V. (2009) 'Diagnostic Exercise: Epithelioid Hemangiosarcoma Mimicking Metastatic Prostatic Neoplasia in a Dog', *Veterinary Pathology*, 46(3), pp. 548–552.
- Sledge, D.G., Webster, J., Kiupel, M. (2016) 'Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection' [en ligne], *The Veterinary Journal*, 215, pp. 43–54. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.06.003> [Consulté le 27 février 2023].
- Smith, A.N. (2003) 'Hemangiosarcoma in dogs and cats' [en ligne], *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33(3), pp. 533–552. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00002-0](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00002-0) [Consulté le 21 décembre 2021].
- Sorenmo, K.U., Jeglum, K.A., Helfand, S.C. (1993) 'Chemotherapy of Canine Hemangiosarcoma With Doxorubicin and Cyclophosphamide', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7(6), pp. 370–376.
- Sorenmo, K.U. *et al.* (2004) 'Efficacy and Toxicity of a Dose-Intensified Doxorubicin Protocol in Canine Hemangiosarcoma', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18, pp. 209–213.
- Soyer, C. and Doliger, S. (2011) *Vade-mecum de cancérologie vétérinaire. 2ème édition*. Paris : Editions Méd'com, 319 p.

- Spangler, W.L., Culbertson, M.R., Kass, P.H. (1994) 'Primary Mesenchymal (Nonangiomatous/ Nonlymphomatous) Neoplasms Occurring in the Canine Spleen: Anatomic Classification, Immunohistochemistry, and Mitotic Activity Correlated with Patient Survival' [en ligne], *Veterinary Pathology*, 31(1), pp. 37–47. Disponible sur : <https://doi.org/10.1177/030098589403100105> [Consulté le 30 mai 2021].
- Spangler, W.L. and Kass, P.H. (1997) 'Pathologic Factors Affecting Postsplenectomy Survival in Dogs' [en ligne], *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11(3), pp. 166–171. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1997.tb00085.x> [Consulté le 24 septembre 2022].
- Stephen, N. and Badhe, B.A. (2022) 'Diagnostic utility of immunohistochemical markers alpha methyl acyl coA racemase (AMACR) and Ets related gene (ERG) in prostate cancer', *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 15(9), pp. 364–372.
- Stockman, D.L. *et al.* (2014) 'ERG and FLI1 protein expression in epithelioid sarcoma', *Modern Pathology*, 27(4), pp. 496–501.
- Tamburini, B.A. *et al.* (2010) 'Gene expression profiling identifies inflammation and angiogenesis as distinguishing features of canine hemangiosarcoma' [en ligne], *BMC Cancer*, 10, p. 619. Disponible sur : <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-619> [Consulté le 22 février 2023].
- The UniProt Consortium. *UniProt : Find your protein* [En ligne]. URL : <https://www.uniprot.org/> [Consulté le 8 mars 2023].
- Thrall, M.A. (2012) *Veterinary hematology and clinical chemistry*. 2nd edition. Ames, Iowa : Wiley-Blackwell, 762 p.
- Tizard, I.R. (2018) *Veterinary immunology*. 10th edition. St. Louis, Missouri : Elsevier, 539 p.
- Treggiari, E. *et al.* (2020) 'Retrospective comparison of first-line adjuvant anthracycline vs metronomic-based chemotherapy protocols in the treatment of stage I and II canine splenic haemangiosarcoma' [en ligne], *Veterinary and Comparative Oncology*, 18(1), pp. 43–51. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/vco.12548> [Consulté le 27 mars 2023].
- U'Ren, L.W., Biller, B.J., Elmslie, R.E., Thamm, D.H., Dow, S.W. (2007) 'Evaluation of a Novel Tumor Vaccine in Dogs with Hemangiosarcoma', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(1), pp. 113–120.
- Vail, D.M. *et al.* (1995) 'Liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine adjuvant immunotherapy for splenic hemangiosarcoma in the dog: a randomized multi-institutional clinical trial', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 1(10), pp. 1165–1170.
- Valli, V.E.O. *et al.* 'Hematopoietic System' [en ligne]. In Grant Maxie, M. (2016), *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 3*. St Louis : Elsevier, pp. 102-268.e1. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5319-1.00013-X> [Consulté le 30 août 2021].
- Vidal, B. de C. and Mello, M.L.S. (2019) 'Toluidine blue staining for cell and tissue biology applications' [en ligne], *Acta Histochemica*, 121(2), pp. 101–112. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.11.005> [Consulté le 18 avril 2023].
- Von Beust, B.R., Suter, M.M., Summers, B.A. (1988) 'Factor VIII-related Antigen in Canine Endothelial Neoplasms: An Immunohistochemical Study' [en ligne], *Veterinary Pathology*, 25(4), pp. 251–255. Disponible sur : <https://doi.org/10.1177/030098588802500401> [Consulté le 3 novembre 2021].
- Wang, G. *et al.* (2017) 'Actionable mutations in canine hemangiosarcoma' [en ligne], *PLoS ONE*, 12(11), p. e0188667. Disponible sur : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188667> [Consulté le 21 février 2023].

- Wang, G. *et al.* (2020) ‘Molecular subtypes in canine hemangiosarcoma reveal similarities with human angiosarcoma’ [en ligne], *PLoS ONE*, 15(3), p. e0229728. Disponible sur : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229728> [Consulté le 21 février 2023].
- Wang, X. *et al.* (2019) ‘Cell-in-Cell Phenomenon and Its Relationship With Tumor Microenvironment and Tumor Progression: A Review’ [en ligne], *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, p. 311. Disponible sur : <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00311> [Consulté le 10 juin 2023].
- Wang, Z.-B., Yuan, J., Chen, W., Wei, L.X. (2014) ‘Transcription factor ERG is a specific and sensitive diagnostic marker for hepatic angiosarcoma’ [en ligne], *World Journal of Gastroenterology*, 20(13), p. 3672. Disponible sur : <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i13.3672> [Consulté le 14 juin 2022].
- Warren, A.L. and Summers, B.A. (2007) ‘Epithelioid Variant of Hemangioma and Hemangiosarcoma in the Dog, Horse, and Cow’ [en ligne], *Veterinary Pathology*, 44(1), pp. 15–24. Disponible sur : <https://doi.org/10.1354/vp.44-1-15> [Consulté le 26 octobre 2022].
- Waters, D.J., Caywood, D.D., Hayden, D.W., Klausner, J.S. (1988) ‘Metastatic pattern in dogs with splenic haemangiosarcoma: Clinical implications’ [en ligne], *Journal of Small Animal Practice*, 29(12), pp. 805–814. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1988.tb01907.x> [Consulté le 7/10/22].
- Webster, J.D., Miller, M.A., DuSold, D., Ramos-Vara, J. (2009) ‘Effects of Prolonged Formalin Fixation on Diagnostic Immunohistochemistry in Domestic Animals’ [en ligne], *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(8), pp. 753–761. Disponible sur : <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.953877> [Consulté le 20 mars 2023].
- Wendelburg, K.M. *et al.* (2015) ‘Survival time of dogs with splenic hemangiosarcoma treated by splenectomy with or without adjuvant chemotherapy: 208 cases (2001–2012)’ , *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 247(4), pp. 393–403.
- Willmann, M. *et al.* (2019) ‘Comparative oncology: The paradigmatic example of canine and human mast cell neoplasms’ [en ligne], *Veterinary and Comparative Oncology*, 17(1), pp. 1–10. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/vco.12440> [Consulté le 27 avril 2023].
- Wittenberns, B.M., Thamm, D.H., Palmer, E.P., Regan, D.P. (2021) ‘Canine Non-Angiogenic, Non-Myogenic Splenic Stromal Sarcoma: a Retrospective Clinicopathological Analysis and Investigation of Podoplanin as a Marker of Tumour Histogenesis’ [en ligne], *Journal of Comparative Pathology*, 188, pp. 1–12. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2021.07.006> [Consulté le 9 novembre 2022].
- Wong, K. *et al.* (2021) ‘Comparison of the oncogenomic landscape of canine and feline hemangiosarcoma shows novel parallels with human angiosarcoma’ [en ligne], *Disease Models & Mechanisms*, 14(7), p. dmm049044. Disponible sur : <https://doi.org/10.1242/dmm.049044> [Consulté le 21 février 2023].
- Wong, S. *et al.* (2022) ‘Genomic landscapes of canine splenic angiosarcoma (hemangiosarcoma) contain extensive heterogeneity within and between patients’ [en ligne], *PLoS ONE*, 17(7). Disponible sur : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264986> [Consulté le 21 février 2023].
- Yaskiv, O. *et al.* (2012) ‘ERG Protein Expression in Human Tumors Detected With a Rabbit Monoclonal Antibody’ [en ligne], *American Journal of Clinical Pathology*, 138(6), pp. 803–810. Disponible sur : <https://doi.org/10.1309/AJCP3K5VUFALZTKC> [Consulté le 15 juin 2022].
- Yuan, L. *et al.* (2011) ‘RhoJ is an endothelial cell-restricted Rho GTPase that mediates vascular morphogenesis and is regulated by the transcription factor ERG’ [en ligne], *Blood*, 118(4), pp. 1145–1153. Disponible sur : <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-315275> [Consulté le 29 octobre 2022].
- Zammarchi, F., Boutsalis, G., Cartegni, L. (2013) ‘5’ UTR Control of Native ERG and of Tmprss2:ERG Variants Activity in Prostate Cancer’ [en ligne], *PLoS ONE*. Édité par Tian, B. 8(3), p. e49721. Disponible sur : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049721> [Consulté le 12 avril 2023].



# ANNEXES

## Annexe 1 : Fiche fournisseur de l'anticorps anti-ERG



KEY-CODE CMC43431030 • EN Rev. 3.0 • p. 1

### ERG (EP111) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

For In Vitro Diagnostic Use (IVD)

#### Product Identification

REF	Description
434R-14	0.1 mL concentrate
434R-15	0.5 mL concentrate
434R-16	1.0 mL concentrate
434R-17	1.0 mL predilute ready-to-use
434R-18	7.0 mL predilute ready-to-use
434R-10	25.0 mL predilute ready-to-use

#### Symbol Definitions

KEY-CODE	keycode
P	predilute
C	concentrate
A	ascites
E	serum
S	supernatant
DIL	concentrate dilution range

#### Intended Use

This antibody is intended for *in vitro* diagnostic (IVD) use.

ERG (EP111) Rabbit Monoclonal Primary Antibody is intended for laboratory use in the detection of the ERG protein in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue stained in qualitative immunohistochemistry (IHC) testing.

The results using this product should be interpreted by a qualified pathologist in conjunction with the patient's relevant clinical history, other diagnostic tests and proper controls.

#### Summary and Explanation

The transcription factor erythroblastosis virus E26 transforming sequence related gene (ERG) functions as a regulator of key cellular functions to promote endothelial homeostasis.<sup>1</sup> Expression of ERG has been observed in both benign and malignant vascular endothelial tumors, such as hemangiomas and Kaposi sarcomas, respectively.<sup>2,3</sup> Carcinomas of the breast, colon, and urothelium have demonstrated absence of ERG expression, whereas presence of the protein has been confirmed in a subset of prostate carcinoma cases.<sup>4,5</sup> Anti-ERG can

be a useful tool for identifying vascular endothelial neoplasms and distinguishing prostate carcinoma from epithelial tumors of non-prostatic origin.

#### Principles and Procedures

The stated primary antibody may be used as the primary antibody for immunohistochemical staining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. In general, immunohistochemical staining in conjunction with a HRP or Alk Phos linked detection system allows the visualization of antigens via the sequential application of a specific antibody (primary antibody) to the antigen, a secondary antibody (link antibody) to the primary antibody, an enzyme complex and a chromogenic substrate with interposed washing steps. The enzymatic activation of the chromogen results in a visible reaction product at the antigen site. The specimen may then be counterstained and a coverslip applied. Results are interpreted using a light microscope.

#### Materials and Methods

##### Reagents Provided

Product Composition	
Predilute: diluted in	Tris Buffer, pH 7.3-7.7, with 1% BSA and <0.1% Sodium Azide
Concentrate: diluted in	Tris Buffer, pH 7.3-7.7, with 1% BSA and <0.1% Sodium Azide
Host	Rabbit
Isotype	IgG
Recommended working dilution range	1:100-1:200
Source	Supernatant

See product label for lot specific information for the following:

1. Antibody immunoglobulin concentration
2. Source details

##### Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration

Prediluted antibody is ready-to-use and optimized for staining. No reconstitution, mixing, dilution, or titration is required. The concentrated antibody is optimized to be diluted to within the dilution range using Cell Marque Diamond Diluent.

##### Materials and Reagents Needed But Not Provided

The following reagents and materials may be required for staining but are not provided with the primary antibody:

1. Positive and negative control tissue
2. Microscope slides, positively charged

3. Drying oven capable of maintaining a temperature of 53–65°C
4. Staining jars or baths
5. Timer
6. Xylene or xylene substitute
7. Ethanol or reagent alcohol  
*Note: Cell Marque's one-step pretreatment, Trilogy™ (cat. #920P-06), can replace both 6 and 7 above.*
8. Deionized or distilled water
9. Heating equipment, such as an electric pressure cooker, for tissue pretreatment step
10. Detection system, such as HiDef Detection™ HRP Polymer System (cat. #954D-20) or HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (cat. #962D-20)
11. Chromogen, such as DAB Substrate Kit (cat. #957D-20) or Permanent Red Chromogen Kit (cat. #960D-10)
12. TBS IHC Wash Buffer + Tween\*\* 20 (cat. #935B-09)
13. Hematoxylin or other counterstain
14. Antibody diluents, such as Diamond: Antibody Diluent (cat. #938B-05) or Emerald: Antibody Diluent (cat. #936B-08)
15. Peroxide Block (cat. #925B-05) for use with HRP
16. Avidin-Biotin Blocking Reagents for use with streptavidin-biotin detection
17. Negative Control Reagent (cat. #939B-02 for universal)
18. Mounting Medium
19. Cover glass
20. Light microscope (40–400x)

#### Storage and Handling

Store at 2–8°C. Do not freeze.

To ensure proper reagent delivery and stability of the antibody after every run, the cap must be replaced and the bottle must be immediately placed in the refrigerator in an upright position.

Every antibody reagent is expiration dated. When properly stored, the reagent is stable to the date indicated on the label. Do not use reagent beyond the expiration date for the prescribed storage method.

There are no definitive signs to indicate instability of this product; therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with unknown specimens. Contact Cell Marque technical support if there is a suspected indication of reagent instability.

#### Specimen Collection and Preparation for Analysis

Routinely processed, neutral-buffered formalin-fixed, paraffin-embedded, tissues are suitable for use with this primary antibody when used with Cell Marque detection kits (see Materials, Reagents, and Equipment Needed But Not Provided section). Note: Cell Marque evaluates performance only on human tissues. The recommended tissue fixative is 10% neutral-buffered formalin. Variable results may occur as a result of prolonged fixation or special processes such as decalcification of bone marrow preparations.

Each section should be cut to the appropriate thickness (approximately 3 µm) and placed on a positively charged glass slide. Slides containing the tissue section may be baked for at least 2 hours (but not longer than 24 hours) in a 53–65°C oven.

#### Warnings and Precautions

1. Take reasonable precautions when handling reagents. Use disposable gloves and lab coats when handling suspected carcinogens or toxic materials (example: xylene).
2. Avoid contact of reagents with eyes and mucous membranes. If reagents come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.
3. Patient specimens and all materials contacting them should be handled as biohazardous materials and disposed of with proper precautions. Never pipette by mouth.
4. Avoid microbial contamination of reagents, as this could produce incorrect results.
5. The user must validate incubation times and temperatures.
6. The prediluted, ready-to-use reagents are optimally diluted, and further dilution may result in loss of antigen staining.
7. The concentrated reagents may be diluted optimally based on validation by user. Any diluent used that is not specifically recommended herein must likewise be validated by the user for both its compatibility and effect on stability.
8. When used according to instructions, this product is not classified as a hazardous substance. The preservative in the reagent is less than 0.1% sodium azide and does not meet the OSHA (USA) criteria for hazardous substance at the stated concentration. See SDS.
9. The user must validate any storage conditions other than those specified in the package insert.
10. Diluent may contain bovine serum albumin and supernatant may contain bovine serum. The products containing fetal bovine serum and products containing bovine serum albumin are purchased from commercial suppliers. Certificates of Origin for the animal source used in these products are on file at Cell Marque. The certificates support that the bovine sources are from countries with negligible BSE risk and state sources of bovine from USA and Canada.
11. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.

#### Instructions For Use

Recommended Staining Protocols for the stated primary antibody:

##### HiDef HRP:

HiDef Detection™ HRP Polymer System (cat. #954D-20)

1. Epitope Retrieval Technique: HIER, Epitope Retrieval Reagent: Trilogy
2. Antibody Incubation Time (Minutes): 10–30
3. HiDef Detection Amplifier Incubation Time (Minutes): 10
4. HiDef Detection Polymer Detector Incubation Time (Minutes): 10
5. DAB Incubation Time (Minutes): 1–10
6. Dehydrate and Coverslip.

##### HiDef Alk Phos:

HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System (cat. #962D-20)

1. Epitope Retrieval Technique: HIER, Epitope Retrieval Reagent: Trilogy
2. Antibody Incubation Time (Minutes): 10–30

3. HiDef Detection Amplifier Incubation Time (Minutes): 10
4. HiDef Detection Polymer Detector Incubation Time (Minutes): 10
5. Permanent Red Incubation Time (Minutes): 15-30
6. Dehydrate and Coverslip.

## Quality Control Procedures

### Positive Tissue Control

A positive tissue control must be run with every staining procedure performed. This tissue may contain both positive and negative staining cells or tissue components and serve as both the positive and negative control tissue. Control tissues should be fresh autopsy, biopsy or surgical specimens prepared or fixed as soon as possible in a manner identical to the test sections. Use of a tissue section fixed or processed differently from the test specimen will serve to provide control for all reagents and method steps except fixation and tissue processing.

A tissue with weak positive staining is more suitable for optimal quality control and for detecting minor levels of reagent degradation. Positive tissue control for the stated primary antibody may include the following:

Positive Tissue Control	
Tissue	Visualization
Tonsil	Nuclear
Hemangioma	Nuclear

Known positive tissue controls should be utilized only for monitoring the correct performance of processed tissues and test reagents, not as an aid in determining a specific diagnosis of patient samples. If the positive tissue controls fail to demonstrate appropriate positive staining, results with the test specimens must be considered invalid.

### Negative Tissue Control

The same tissue used for the positive tissue control may be used as the negative tissue control. The variety of cell types present in most tissue sections offers internal negative control sites, but this should be verified by the user. The components that do not stain should demonstrate the absence of specific staining, and provide an indication of non-specific background staining. If specific staining occurs in the negative tissue control sites, results with the patient specimens must be considered invalid.

### Unexplained Discrepancies

Unexplained discrepancies in controls should be referred to Cell Marque technical support immediately. If quality control results do not meet specifications, patient results are invalid. See the Troubleshooting section of this insert. Identify and correct the problem, then repeat the entire procedure with the patient samples.

### Negative Control Reagent

A negative control reagent must be run for every specimen to aid in the interpretation of results. A negative control reagent is used in place of the primary antibody to evaluate nonspecific staining. The slide should be treated with negative control reagent, matching the host species of the primary antibody, and ideally having the same IgG concentration. The incubation period for the negative control reagent should equal the primary antibody incubation period.

## Interpretation of Results

The immunostaining procedure causes a colored reaction product to precipitate at the antigen sites localized by the primary antibody. Refer to the appropriate detection system package insert for expected color reactions. A qualified pathologist experienced in immunohistochemistry procedures must evaluate positive and negative tissue controls before interpreting results.

### Positive Tissue Control

The stained positive tissue control should be examined first to ascertain that all reagents are functioning properly. The presence of an appropriately colored reaction product within the target cells is indicative of positive reactivity. Refer to the package insert of the detection system used for expected color reactions. Depending on the incubation length and potency of the hematoxylin used, counterstaining will result in a pale to dark blue coloration of cell nuclei. Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results. If the positive tissue control fails to demonstrate appropriate positive staining, any results with the test specimens are considered invalid.

### Negative Tissue Control

The negative tissue control should be examined after the positive tissue control to verify the specific labeling of the target antigen by the primary antibody. The absence of specific staining in the negative tissue control confirms the lack of antibody cross reactivity to cells or cellular components. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimen are considered invalid. Nonspecific staining, if present, will have a diffuse appearance. Sporadic light staining of connective tissue may also be observed in sections from tissues that are not optimally fixed. Intact cells should be used for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells show non-specific staining.

### Patient Tissue

Patient specimens should be examined last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen in question was not detected, not that the antigen is absent in the cells or tissue assayed. A panel of antibodies may aid in the identification of false negative reactions (see Summary of Expected Results section). The morphology of each tissue sample should also be examined utilizing a hematoxylin and eosin stained section when interpreting any immunohistochemical result. The patient's morphologic findings and pertinent clinical data must be interpreted by a qualified pathologist.

## Limitations

1. Color does not affect performance.
2. This reagent is "for professional use only" as immunohistochemistry is a multiple step process that requires specialized training in the selection of the appropriate reagents, tissues, fixation, processing; preparation of the immunohistochemistry slide; and interpretation of the staining results.
3. For laboratory use only.
4. For *in vitro* diagnostic use.
5. Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning, or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may result from variations in fixation and embedding methods, as well as from inherent irregularities within the tissue.

6. Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.
7. The clinical interpretation of any positive staining, or its absence, must be evaluated within the context of clinical history, morphology, other histopathological criteria as well as other diagnostic tests. This antibody is intended to be used in a panel of antibodies if applicable. It is the responsibility of a qualified pathologist to be familiar with the antibodies, reagents, diagnostic panels, and methods used to produce the stained preparation. Staining must be performed in a certified, licensed laboratory under the supervision of a pathologist who is responsible for reviewing the stained slides and assuring the adequacy of positive and negative controls.
8. Cell Marque provides antibodies and reagents at optimal dilution for use as instructed. Any deviation from recommended test procedures may invalidate expected results. Appropriate controls must be employed and documented. Users in any circumstance must accept responsibility for interpretation of patient results.
9. Cell Marque provides primary antibodies in concentrated format so that the user may subsequently optimally dilute for use subject to the user's determination of and adherence to suitable validation techniques. Users must validate the use of any diluents other than what is recommended herein. Once the primary is validated to be suitable for use, any deviation from recommended test procedures may invalidate expected results. Appropriate controls must be employed and documented. Users in any circumstance must accept responsibility for interpretation of patient results.
10. This product is not intended for use in flow cytometry.
11. Reagents may demonstrate unexpected reactions in previously untested tissues. The possibility of unexpected reactions even in tested tissue groups cannot be completely eliminated because of biological variability of antigen expression in neoplasms, or other pathological tissues. Contact Cell Marque technical support with any suspected, documented unexpected reactions.
12. Tissues from persons infected with hepatitis B virus and containing hepatitis B surface antigen (HBsAg) may exhibit nonspecific staining with horseradish peroxidase.
13. When used in blocking steps, normal sera from the same animal source as the secondary antisera may cause false negative or false positive results because of the effect of autoantibodies or natural antibodies.
14. False positive results may be seen because of non immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by pseudoperoxidase activity (erythrocytes), endogenous peroxidase activity (cytochrome C), or endogenous biotin (example: liver, brain, breast, kidney) subject to the type of immunostaining technique used.
15. As with any immunohistochemistry test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells or tissue assayed.
16. The prediluted antibody products are optimized as a ready-to-use product. Because of the possibility of variation in tissue fixation and processing, it may be necessary to increase or decrease the primary antibody incubation time on individual specimens.
17. The antibody, in combination with detection systems and accessories, detects antigen(s) that survive routine formalin fixation, tissue processing and sectioning. Users who deviate from recommended test procedures remain, as they would in any circumstance, responsible for interpretation and validation of patient results.

### Summary of Expected Results

See the following tables of reactivity:

Normal Study			
Tissue	# Stained (+)	Total #	Notes
Brain	0	1	
Adrenal Cortex	0	1	
Ovary	0	1	
Pancreas	0	1	
Parathyroid	0	1	
Pituitary	0	1	
Testis	0	1	
Thyroid	0	1	
Breast	0	2	
Spleen	1	1	
Tonsil	1	1	
Thymus	0	1	
Bone Marrow	0	1	
Lung	0	2	
Heart	0	1	
Esophagus	0	1	
Stomach	0	1	
Small Intestine	0	1	
Colon	0	1	
Liver	0	1	
Salivary Gland	0	1	
Gall Bladder	0	1	
Kidney	0	1	
Bladder	0	1	
Prostate	0	2	
Uterus	0	2	
Fallopian Tube	0	1	
Ureter	0	1	
Cervix	0	1	
Skeletal Muscle	0	1	
Smooth Muscle	0	1	

Normal Study			
Tissue	# Stained (+)	Total #	Notes
Skin	0	1	
Peripheral Nerve	0	1	
Mesothelium	0	1	
Fat	0	1	
Placenta	0	1	

This antibody stains normal tissues as indicated in literature.

Disease Tissue Study			
Tissue	# Stained (+)	Total #	Notes
Prostate carcinoma	18	66	
Kaposi's Sarcoma	5	5	
Hemangioma	2	2	
Paranglioma	1	1	
Angiomyolipoma	0	4	
Colorectal adenocarcinoma	0	5	
Invasive ductal carcinoma	0	35	
Transitional cell carcinoma	0	7	

This antibody stains tumors as indicated in literature.

## Troubleshooting

1. If the positive control exhibits weaker staining than expected, other positive controls run during the same staining run should be checked to determine if it is because of the primary antibody or one of the common secondary reagents.
2. If the positive control is negative, other positive controls used on the same run should be checked to determine if the underlying cause relates to the primary antibody or one of the common secondary reagents. Tissues may have been improperly collected, fixed or deparaffinized. The proper procedure should be followed for collection, storage, and fixation.
3. If excessive background staining occurs, high levels of endogenous biotin may be present. A biotin blocking step should be included unless a biotin-free detection system is being used in which case any biotin present would not be a contributing factor to background staining.
4. If all of the paraffin has not been removed, the deparaffinization procedure should be repeated.
5. If tissue sections wash off the slide, slides should be checked to ensure that they are positively charged. Other possibilities that could have adverse affect on tissue adhesion include insufficient drying of the tissue section on the slide prior to staining or fixation

in formalin that was not properly neutral-buffered. Tissue thickness may also be a contributing factor.

For corrective action, refer to the Instructions for Use section or contact Cell Marque technical support at [techsupport@cellmarque.com](mailto:techsupport@cellmarque.com).

## References

1. Shah AV, et al. Regulation of endothelial homeostasis, vascular development and angiogenesis by the transcription factor ERG. *Vascul Pharmacol.* 2016; 86:3-13.
2. Miettinen M, et al. ERG transcription factor as an immunohistochemical marker for vascular endothelial tumors and prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2011; 35:432-41.
3. Hornick JL. Novel uses of immunohistochemistry in the diagnosis and classification of soft tissue tumors. *Mod Pathol.* 2014; 27:547-563.
4. Yaskiv O, et al. ERG protein expression in human tumors detected with a rabbit monoclonal antibody. *Am J Clin Pathol.* 2012; 138:803-10.
5. Minner S, et al. Marked heterogeneity of ERG expression in large primary prostate cancers. *Mod Pathol.* 2013; 26:106-16.

## Disclaimers

Cell Marque is the legal manufacturer of the Cell Marque + RabMab branded in vitro diagnostics antibodies. Cell Marque utilizes RabMab Technology from Abcam PLC for this brand. The rabbit monoclonal technology is patented and RabMab is a registered trademark of Abcam PLC.

\*TWEEN is a registered trademark of Croda International PLC.

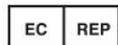
©2017 Sigma-Aldrich Co. LLC. All rights reserved. SIGMA-ALDRICH is a trademark of Sigma-Aldrich Co. LLC, registered in the US and other countries. Cell Marque, Trilogy, Declere, and HiDefDetection are trademarks of Sigma-Aldrich Co. LLC or its affiliates.



[www.cellmarque.com](http://www.cellmarque.com)



6600 Sierra College Blvd. • Rocklin, CA 95677 USA • 916-746-8900



EMERGO EUROPE

Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands



CM Template #2.4

Implementation date 31 Oct 2017

## Annexe 2 : Fiche fournisseur de l'anticorps anti-CD31



### Product datasheet

## Anti-CD31 antibody [C31.3 + JC/70A] ab199012

★★★★★ 4 Abreviews 14 References 3 Images

#### Overview

<b>Product name</b>	Anti-CD31 antibody [C31.3 + JC/70A]
<b>Description</b>	Mouse monoclonal [C31.3 + JC/70A] to CD31
<b>Host species</b>	Mouse
<b>Tested applications</b>	<b>Suitable for:</b> WB, IHC-P
<b>Species reactivity</b>	<b>Reacts with:</b> Human
<b>Immunogen</b>	<b>This product was produced with the following immunogens:</b> Recombinant full length protein corresponding to Human CD31. (C31.3) Database link: <a href="#">P16284</a>  Tissue, cells or virus corresponding to Human CD31. Membrane preparation of a spleen from a patient with hairy cell leukemia. (JC/70A)
<b>Positive control</b>	WB: THP1 whole cell lysate ( <a href="#">ab7913</a> ); IHC-P: Human colon carcinoma and angiosarcoma.
<b>General notes</b>	<p>The Life Science industry has been in the grips of a reproducibility crisis for a number of years. Abcam is leading the way in addressing this with our range of recombinant monoclonal antibodies and knockout edited cell lines for gold-standard validation. Please check that this product meets your needs before purchasing.</p> <p>If you have any questions, special requirements or concerns, please send us an inquiry and/or contact our Support team ahead of purchase. Recommended alternatives for this product can be found below, along with publications, customer reviews and Q&amp;As</p> <p>Please note that this antibody is an oligoclonal antibody. It is a cocktail of monoclonal antibodies that have been carefully selected. Oligoclonal antibodies have not only the specificity and batch-to-batch consistency of a monoclonal antibody, but also have the advantage of the sensitivity of a polyclonal antibody due to their ability to recognize multiple epitopes on an antigen.</p>

#### Properties

<b>Form</b>	Liquid
<b>Storage instructions</b>	Shipped at 4°C. Store at +4°C short term (1-2 weeks). Upon delivery aliquot. Store at -20°C long term. Avoid freeze / thaw cycle.
<b>Storage buffer</b>	pH: 7.2 Preservative: 0.05% Sodium azide

1

	Constituents: 99% PBS, 0.05% BSA
<b>Purity</b>	Protein G purified
<b>Purification notes</b>	ab199012 was purified from Bioreactor Concentrate.
<b>Clonality</b>	Monoclonal
<b>Clone number</b>	C31.3 + JC/70A
<b>Isotype</b>	IgG1
<b>Light chain type</b>	kappa

### Applications

**The Abpromise guarantee** Our [Abpromise guarantee](#) covers the use of ab199012 in the following tested applications. The application notes include recommended starting dilutions; optimal dilutions/concentrations should be determined by the end user.

Application	Abreviews	Notes
WB		Use a concentration of 1 - 2 µg/ml. Predicted molecular weight: 82 kDa.
IHC-P	★★★★★ (3)	Use a concentration of 1 - 2 µg/ml. Staining of formalin-fixed tissues requires boiling tissue sections in 1mM EDTA, pH 7.5-8.5, for 10-20 min followed by cooling at RT for 20 minutes.  The ideal fixation time will depend on the size of the tissue block and the type of tissue, but fixation between 18–24h is suitable for most samples

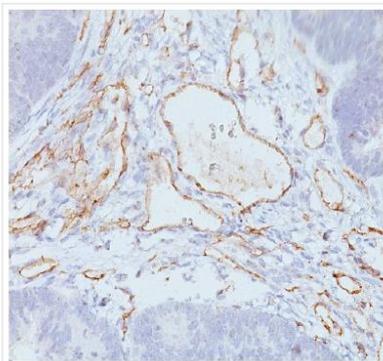
### Target

**Function** Induces susceptibility to atherosclerosis (By similarity). Cell adhesion molecule which is required for leukocyte transendothelial migration (TEM) under most inflammatory conditions. Tyr-690 plays a critical role in TEM and is required for efficient trafficking of PECAM1 to and from the lateral border recycling compartment (LBRC) and is also essential for the LBRC membrane to be targeted around migrating leukocytes. Prevents phagocyte ingestion of closely apposed viable cells by transmitting 'detachment' signals, and changes function on apoptosis, promoting tethering of dying cells to phagocytes (the encounter of a viable cell with a phagocyte via the homophilic interaction of PECAM1 on both cell surfaces leads to the viable cell's active repulsion from the phagocyte. During apoptosis, the inside-out signaling of PECAM1 is somehow disabled so that the apoptotic cell does not actively reject the phagocyte anymore. The lack of this repulsion signal together with the interaction of the eat-me signals and their respective receptors causes the attachment of the apoptotic cell to the phagocyte, thus triggering the process of engulfment). Isoform Delta15 is unable to protect against apoptosis. Modulates BDKRB2 activation. Regulates bradykinin- and hyperosmotic shock-induced ERK1/2 activation in human umbilical cord vein cells (HUVEC).

**Tissue specificity** Expressed on platelets and leukocytes and is primarily concentrated at the borders between endothelial cells. Isoform Long predominates in all tissues examined. Isoform Delta12 is detected only in trachea. Isoform Delta14-15 is only detected in lung. Isoform Delta14 is detected in all tissues examined with the strongest expression in heart. Isoform Delta15 is expressed in brain, testis, ovary, cell surface of platelets, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), Jurkat T-

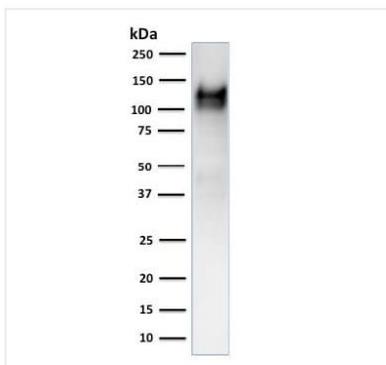
	cell leukemia, human erythroleukemia (HEL) and U937 histiocytic lymphoma cell lines (at protein level).
<b>Sequence similarities</b>	Contains 6 Ig-like C2-type (immunoglobulin-like) domains.
<b>Domain</b>	The Ig-like C2-type domains 2 and 3 contribute to formation of the complex with BDKRB2 and in regulation of its activity.
<b>Post-translational modifications</b>	Phosphorylated on Ser and Tyr residues after cellular activation. In endothelial cells Fyn mediates mechanical-force (stretch or pull) induced tyrosine phosphorylation.
<b>Cellular localization</b>	Membrane. Cell junction. Localizes to the lateral border recycling compartment (LBRC) and recycles from the LBRC to the junction in resting endothelial cells and Cell junction. Localizes to the lateral border recycling compartment (LBRC) and recycles from the LBRC to the junction in resting endothelial cells.

## Images



Immunohistochemistry (Formalin/PFA-fixed paraffin-embedded sections) analysis of human colon carcinoma tissue labelling CD31 with ab199012.

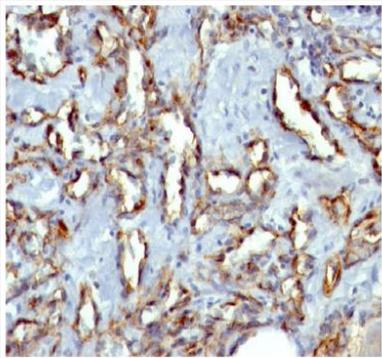
Immunohistochemistry (Formalin/PFA-fixed paraffin-embedded sections) - Anti-CD31 antibody [C31.3 + JC/70A] (ab199012)



Anti-CD31 antibody [C31.3 + JC/70A] (ab199012) at 2 µg/ml + THP-1 (human monocytic leukemia cell line) whole cell lysate

**Predicted band size:** 82 kDa

Western blot - Anti-CD31 antibody [C31.3 + JC/70A] (ab199012)



Immunohistochemistry (Formalin/PFA-fixed paraffin-embedded sections) analysis of human angiosarcoma tissue labelling CD31 with ab199012.

Immunohistochemistry (Formalin/PFA-fixed paraffin-embedded sections) - Anti-CD31 antibody [C31.3 + JC/70A] (ab199012)

**Please note:** All products are "FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES"

#### **Our Abpromise to you: Quality guaranteed and expert technical support**

---

- Replacement or refund for products not performing as stated on the datasheet
- Valid for 12 months from date of delivery
- Response to your inquiry within 24 hours
- We provide support in Chinese, English, French, German, Japanese and Spanish
- Extensive multi-media technical resources to help you
- We investigate all quality concerns to ensure our products perform to the highest standards

If the product does not perform as described on this datasheet, we will offer a refund or replacement. For full details of the Abpromise, please visit <https://www.abcam.com/abpromise> or contact our technical team.

#### **Terms and conditions**

---

- Guarantee only valid for products bought direct from Abcam or one of our authorized distributors

## Annexe 3 : Protocole de coloration spéciale au bleu de Toluidine

### 1. Réactifs utilisés

Réactif / matériel	Laboratoire fournisseur	Référence
Lames Superfrost plus	VWR	631-9483
Lamelles couvre-objets 24x60 mm	VWR	631-1339
Ottix	Microm	T/X0086
Ottix Shapper	Microm	T/02070079
Alcool absolu Normapur	VWR	20821-321
Acétone	VWR	20.065.362
Acide citrique	Carlo Erba	403727
Phosphate dissodique	Prolabo	28.028.298
Bleu de Toluidine	Réactifs RAL	361590
Milieu de montage (Diamount mounting medium)	Microm	T/030400

### 2. Solutions à préparer

**Solution d'acide citrique** : Mélanger 4,10 g d'acide citrique avec 1 L d'eau distillée.

**Solution de phosphate** : Mélanger 28,38 g de phosphate disodique avec 1 L d'eau distillée.

**Solution de tampon phosphate** : Mélanger 32,20 mL de solution d'acide citrique avec 67,80 mL de solution de phosphate.

**Solution de bleu de toluidine** : Mélanger 0,1 g de bleu de toluidine avec 100 mL de solution de tampon phosphate.

### 3. Mode opératoire

Les lames utilisées sont des lames Superfrost Plus (VWR # 631-9483) sur lesquelles sont apposées un prélèvement déshydraté et paraffiné, d'une épaisseur de 2  $\mu\text{m}$ , sortant d'une étuve à 30°C où elles ont été laissées plusieurs heures.

### **3.1. Réhydratation des lames**

- Placer les lames dans des bains successifs de solvants de la façon suivante :
  - 3 bains d'Ottix 10 minutes
  - 1 bain d'Ottix Shapper 2 minutes
  - 1 bain d'alcool 1 minute
  - 2 bains d'eau du robinet de 30 secondes

Les sections de tissus sont alors réhydratées et doivent toujours être placées dans un milieu aqueux.

### **3.2 Coloration des lames**

- Poser les lames sur un porte-lame au-dessus d'un récipient.
- Déposer quelques gouttes de solution de bleu de toluidine à la pipette pasteur et laisser poser 30 minutes.
- Rincer les lames avec du tampon phosphate pendant 15 secondes, à l'aide d'une pipette pasteur.
- Essorer les lames à l'aide de papier absorbant.

### **3.3 Déshydratation des lames**

- Plonger les lames dans un bain d'acétone pendant 15 à 30 secondes.
- Transférer les lames sur un portoir métallique.
- Plonger les lames dans deux bains d'Ottix successifs de 5 minutes.
- Coller une lamelle sur chaque lame à l'aide d'une ligne fine de milieu de montage étalée par capillarité.

## Annexe 4 : Alignement des séquences d'acides aminés des isoformes de la protéine ERG humaine

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

sp|P11308-6|ERG_HUMAN      MIQTVDPAAHIKEALSVVSEDQSLFECAYGTPHLAKTEMTASSSSDYGQTSKMSPRVPQ 60
sp|P11308-1|ERG_HUMAN      MIQTVDPAAHIKEALSVVSEDQSLFECAYGTPHLAKTEMTASSSSDYGQTSKMSPRVPQ 60
sp|P11308-2|ERG_HUMAN      ----- 0
sp|P11308-5|ERG_HUMAN      MIQTVDPAAHIKEALSVVSEDQSLFECAYGTPHLAKTEMTASSSSDYGQTSKMSPRVPQ 60
sp|P11308-4|ERG_HUMAN      -----MASTIKEALSVVSEDQSLFECAYGTPHLAKTEMTASSSSDYGQTSKMSPRVPQ 53
sp|P11308-3|ERG_HUMAN      MIQTVDPAAHIKEALSVVSEDQSLFECAYGTPHLAKTEMTASSSSDYGQTSKMSPRVPQ 60

sp|P11308-6|ERG_HUMAN      QDWLSQPPARVTIKMECNPSQVNGSRNSPDECSVAKGGKMGVSPDVTGMNYGSYMEEKHM 120
sp|P11308-1|ERG_HUMAN      QDWLSQPPARVTIKMECNPSQVNGSRNSPDECSVAKGGKMGVSPDVTGMNYGSYMEEKHM 120
sp|P11308-2|ERG_HUMAN      -----MVGSPDVTGMNYGSYMEEKHM 21
sp|P11308-5|ERG_HUMAN      QDWLSQPPARVTIKMECNPSQVNGSRNSPDECSVAKGGKMGVSPDVTGMNYGSYMEEKHM 120
sp|P11308-4|ERG_HUMAN      QDWLSQPPARVTIKMECNPSQVNGSRNSPDECSVAKGGKMGVSPDVTGMNYGSYMEEKHM 113
sp|P11308-3|ERG_HUMAN      QDWLSQPPARVTIKMECNPSQVNGSRNSPDECSVAKGGKMGVSPDVTGMNYGSYMEEKHM 120
                                     *****

sp|P11308-6|ERG_HUMAN      PPPNMTNERRVIVPADPTLWSTDHVRQWLEWAVKEYGLPDVNILLFQIDGKELCKMTK 180
sp|P11308-1|ERG_HUMAN      PPPNMTNERRVIVPADPTLWSTDHVRQWLEWAVKEYGLPDVNILLFQIDGKELCKMTK 180
sp|P11308-2|ERG_HUMAN      PPPNMTNERRVIVPADPTLWSTDHVRQWLEWAVKEYGLPDVNILLFQIDGKELCKMTK 81
sp|P11308-5|ERG_HUMAN      PPPNMTNERRVIVPADPTLWSTDHVRQWLEWAVKEYGLPDVNILLFQIDGKELCKMTK 180
sp|P11308-4|ERG_HUMAN      PPPNMTNERRVIVPADPTLWSTDHVRQWLEWAVKEYGLPDVNILLFQIDGKELCKMTK 173
sp|P11308-3|ERG_HUMAN      PPPNMTNERRVIVPADPTLWSTDHVRQWLEWAVKEYGLPDVNILLFQIDGKELCKMTK 180
                                     *****

sp|P11308-6|ERG_HUMAN      DDFQRLTPSYNADILLSHLHYLRETPLPHLTSDDDVKALQNSPRLMHARNTGGAAFIFPN 240
sp|P11308-1|ERG_HUMAN      DDFQRLTPSYNADILLSHLHYLRETPLPHLTSDDDVKALQNSPRLMHARNT----- 231
sp|P11308-2|ERG_HUMAN      DDFQRLTPSYNADILLSHLHYLRETPLPHLTSDDDVKALQNSPRLMHARNT----- 132
sp|P11308-5|ERG_HUMAN      DDFQRLTPSYNADILLSHLHYLRETPLPHLTSDDDVKALQNSPRLMHARNTGGAAFIFPN 240
sp|P11308-4|ERG_HUMAN      DDFQRLTPSYNADILLSHLHYLRETPLPHLTSDDDVKALQNSPRLMHARNTGGAAFIFPN 233
sp|P11308-3|ERG_HUMAN      DDFQRLTPSYNADILLSHLHYLRETPLPHLTSDDDVKALQNSPRLMHARNTGGAAFIFPN 240
                                     *****

sp|P11308-6|ERG_HUMAN      TSVYPEATQRITTRPGTKTPL--CDLFIERHPRCPAEIR---ALSHVI-QRELIPELKP- 293
sp|P11308-1|ERG_HUMAN      -----DLPYEPRRSAWTGHGHPTPQSKAAQSPSTVPKTEDQRPQLDPY 276
sp|P11308-2|ERG_HUMAN      -----DLPYEPRRSAWTGHGHPTPQSKAAQSPSTVPKTEDQRPQLDPY 177
sp|P11308-5|ERG_HUMAN      TSVYPEATQRITTRPDLPYEPRRSAWTGHGHPTPQSKAAQSPSTVPKTEDQRPQLDPY 300
sp|P11308-4|ERG_HUMAN      TSVYPEATQRITTRPDLPYEPRRSAWTGHGHPTPQSKAAQSPSTVPKTEDQRPQLDPY 293
sp|P11308-3|ERG_HUMAN      TSVYPEATQRITTRPDLPYEPRRSAWTGHGHPTPQSKAAQSPSTVPKTEDQRPQLDPY 300
                                     . . . : : * . : * * . : * : *

sp|P11308-6|ERG_HUMAN      -----VPDSL----ILPLLIWRLNP--LKPFSKT--TL----KELRA---D----- 325
sp|P11308-1|ERG_HUMAN      QILGPTSSRLANPGSGQIQLWQFLELLSDSSNSSCITWEGTNGEFKMTDPDEVARRWGE 336
sp|P11308-2|ERG_HUMAN      QILGPTSSRLANPGSGQIQLWQFLELLSDSSNSSCITWEGTNGEFKMTDPDEVARRWGE 237
sp|P11308-5|ERG_HUMAN      QILGPTSSRLANPGWTQ----- 317
sp|P11308-4|ERG_HUMAN      QILGPTSSRLANPGSGQIQLWQFLELLSDSSNSSCITWEGTNGEFKMTDPDEVARRWGE 353
sp|P11308-3|ERG_HUMAN      QILGPTSSRLANPGSGQIQLWQFLELLSDSSNSSCITWEGTNGEFKMTDPDEVARRWGE 360
                                     . . *

```

sp P11308-6 ERG_HUMAN	-----	325
sp P11308-1 ERG_HUMAN	RKSKPNMNYDKLSRALRYYYDKNIMTKVHGKRYAYKDFDHGIAQALQHPPESSLYKYPS	396
sp P11308-2 ERG_HUMAN	RKSKPNMNYDKLSRALRYYYDKNIMTKVHGKRYAYKDFDHGIAQALQHPPESSLYKYPS	297
sp P11308-5 ERG_HUMAN	-----	317
sp P11308-4 ERG_HUMAN	RKSKPNMNYDKLSRALRYYYDKNIMTKVHGKRYAYKDFDHGIAQALQHPPESSLYKYPS	413
sp P11308-3 ERG_HUMAN	RKSKPNMNYDKLSRALRYYYDKNIMTKVHGKRYAYKDFDHGIAQALQHPPESSLYKYPS	420

sp P11308-6 ERG_HUMAN	-----	325
sp P11308-1 ERG_HUMAN	DLPYMGSYHAHPQKMNFAVAPHPALPVTSSSFFAAPNPYWNSPTGGIYPNTRLPTSHMPS	456
sp P11308-2 ERG_HUMAN	DLPYMGSYHAHPQKMNFAVAPHPALPVTSSSFFAAPNPYWNSPTGGIYPNTRLPTSHMPS	357
sp P11308-5 ERG_HUMAN	-----	317
sp P11308-4 ERG_HUMAN	DLPYMGSYHAHPQKMNFAVAPHPALPVTSSSFFAAPNPYWNSPTGGIYPNTRLPTSHMPS	473
sp P11308-3 ERG_HUMAN	DLPYMGSYHAHPQKMNFAVAPHPALPVTSSSFFAAPNPYWNSPTGGIYPNTRLPTSHMPS	480

sp P11308-6 ERG_HUMAN	-----	325
sp P11308-1 ERG_HUMAN	HLGTYY	462
sp P11308-2 ERG_HUMAN	HLGTYY	363
sp P11308-5 ERG_HUMAN	-----	317
sp P11308-4 ERG_HUMAN	HLGTYY	479
sp P11308-3 ERG_HUMAN	HLGTYY	486

## Annexe 5 : Aligement des séquences d'acides aminés des isoformes de la protéine ERG canine

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

tr	A0A8I3Q0M2	A0A8I3Q0M2_CANLF	-----MVQTVDPDPAHIKEALS	VVSE	DQSLFECAYGTPHLAKTDMTAS	43	
tr	A0A8I3S701	A0A8I3S701_CANLF	-----MVQTVDPDPAHIKEALS	VVSE	DQSLFECAYGTPHLAKTDMTAS	43	
tr	A0A8I3PZU9	A0A8I3PZU9_CANLF	-----MVQTVDPDPAHIKEALS	VVSE	DQSLFECAYGTPHLAKTDMTAS	43	
tr	A0A8I3PZR0	A0A8I3PZR0_CANLF	MVLL	LQFFSCVLYLKTFLAISTCLVPPFFKEALS	VVSE	DQSLFECAYGTPHLAKTDMTAS	60
tr	A0A8I3S712	A0A8I3S712_CANLF	MVLL	LQFFSCVLYLKTFLAISTCLVPPFFKEALS	VVSE	DQSLFECAYGTPHLAKTDMTAS	60
tr	A0A8I3SC08	A0A8I3SC08_CANLF	-----MVQTVDPDPAHIKEALS	VVSE	DQSLFECAYGTPHLAKTDMTAS	43	
tr	A0A8I3Q0I1	A0A8I3Q0I1_CANLF	-----MASTI	KEALS	VVSE	DQSLFECAYGTPHLAKTDMTAS	36
			:*****				
tr	A0A8I3Q0M2	A0A8I3Q0M2_CANLF	SSGDY	GGQTSKMSPRVPQQDWLSQPPARVTIKMECNPNQVNGSRNSPDECSMAKGGK	MVGS	103	
tr	A0A8I3S701	A0A8I3S701_CANLF	SSGDY	GGQTSKMSPRVPQQDWLSQPPARVTIKMECNPNQVNGSRNSPDECSMAKGGK	MVGS	103	
tr	A0A8I3PZU9	A0A8I3PZU9_CANLF	SSGDY	GGQTSKMSPRVPQQDWLSQPPARVTIKMECNPNQVNGSRNSPDECSMAKGGK	MVGS	103	
tr	A0A8I3PZR0	A0A8I3PZR0_CANLF	SSGDY	GGQTSKMSPRVPQQDWLSQPPARVTIKMECNPNQVNGSRNSPDECSMAKGGK	MVGS	120	
tr	A0A8I3S712	A0A8I3S712_CANLF	SSGDY	GGQTSKMSPRVPQQDWLSQPPARVTIKMECNPNQVNGSRNSPDECSMAKGGK	MVGS	120	
tr	A0A8I3SC08	A0A8I3SC08_CANLF	SSGDY	GGQTSKMSPRVPQQDWLSQPPARVTIKMECNPNQVNGSRNSPDECSMAKGGK	MVGS	103	
tr	A0A8I3Q0I1	A0A8I3Q0I1_CANLF	SSGDY	GGQTSKMSPRVPQQDWLSQPPARVTIKMECNPNQVNGSRNSPDECSMAKGGK	MVGS	96	
			*****				
tr	A0A8I3Q0M2	A0A8I3Q0M2_CANLF	PDTVGM	NYGSYMEEKHMPPPNMTTNERRIVPADPTLWSTDHVRQWLEWAVKEYGLPDVD		163	
tr	A0A8I3S701	A0A8I3S701_CANLF	PDTVGM	NYGSYMEEKHMPPPNMTTNERRIVPADPTLWSTDHVRQWLEWAVKEYGLPDVD		163	
tr	A0A8I3PZU9	A0A8I3PZU9_CANLF	PDTVGM	NYGSYMEEKHMPPPNMTTNERRIVPADPTLWSTDHVRQWLEWAVKEYGLPDVD		163	
tr	A0A8I3PZR0	A0A8I3PZR0_CANLF	PDTVGM	NYGSYMEEKHMPPPNMTTNERRIVPADPTLWSTDHVRQWLEWAVKEYGLPDVD		180	
tr	A0A8I3S712	A0A8I3S712_CANLF	PDTVGM	NYGSYMEEKHMPPPNMTTNERRIVPADPTLWSTDHVRQWLEWAVKEYGLPDVD		180	
tr	A0A8I3SC08	A0A8I3SC08_CANLF	PDTVGM	NYGSYMEEKHMPPPNMTTNERRIVPADPTLWSTDHVRQWLEWAVKEYGLPDVD		163	
tr	A0A8I3Q0I1	A0A8I3Q0I1_CANLF	PDTVGM	NYGSYMEEKHMPPPNMTTNERRIVPADPTLWSTDHVRQWLEWAVKEYGLPDVD		156	
			*****				
tr	A0A8I3Q0M2	A0A8I3Q0M2_CANLF	ILLFQ	NIDGKELCKMTKDDFQRLTPSYNADILLSHLHYLRE	-----	204	
tr	A0A8I3S701	A0A8I3S701_CANLF	ILLFQ	NIDGKELCKMTKDDFQRLTPSYNADILLSHLHYLRE	-----	204	
tr	A0A8I3PZU9	A0A8I3PZU9_CANLF	ILLFQ	NIDGKELCKMTKDDFQRLTPSYNADILLSHLHYLRE	TPLPHLTSDDVDKALQNSP	223	
tr	A0A8I3PZR0	A0A8I3PZR0_CANLF	ILLFQ	NIDGKELCKMTKDDFQRLTPSYNADILLSHLHYLRE	TPLPHLTSDDVDKALQNSP	240	
tr	A0A8I3S712	A0A8I3S712_CANLF	ILLFQ	NIDGKELCKMTKDDFQRLTPSYNADILLSHLHYLRE	TPLPHLTSDDVDKALQNSP	240	
tr	A0A8I3SC08	A0A8I3SC08_CANLF	ILLFQ	NIDGKELCKMTKDDFQRLTPSYNADILLSHLHYLRE	TPLPHLTSDDVDKALQNSP	223	
tr	A0A8I3Q0I1	A0A8I3Q0I1_CANLF	ILLFQ	NIDGKELCKMTKDDFQRLTPSYNADILLSHLHYLRE	TPLPHLTSDDVDKALQNSP	216	
			*****				
tr	A0A8I3Q0M2	A0A8I3Q0M2_CANLF	-----	RGAAFIFPNTSVVPEATQRITTRPDL	PYDPPRRSAWTS	SHGHPTPQSKAAQPS	256
tr	A0A8I3S701	A0A8I3S701_CANLF	-----	NLPYDPPRRSAWTS	SHGHPTPQSKAAQPS		232
tr	A0A8I3PZU9	A0A8I3PZU9_CANLF	RLMHARNT	GGAAFIFPNTSVVPEATQRITTRPA	-----	AQPS	260
tr	A0A8I3PZR0	A0A8I3PZR0_CANLF	RLMHARNT	-----	DLPYDPPRRSAWTS	SHGHPTPQSKAAQPS	276
tr	A0A8I3S712	A0A8I3S712_CANLF	RLMHARNT	GGAAFIFPNTSVVPEATQRITTRPDL	PYDPPRRSAWTS	SHGHPTPQSKAAQPS	300
tr	A0A8I3SC08	A0A8I3SC08_CANLF	RLMHARNT	-----	DLPYDPPRRSAWTS	SHGHPTPQSKAAQPS	259
tr	A0A8I3Q0I1	A0A8I3Q0I1_CANLF	RLMHARNT	-----	DLPYDPPRRSAWTS	SHGHPTPQSKAAQPS	252
			****				
tr	A0A8I3Q0M2	A0A8I3Q0M2_CANLF	PSAVPK	TEDQRPQLDPYQILGPTSSRLANPGSGQIQLWQF	LLELLSDSSNSNCITWEGTN		316
tr	A0A8I3S701	A0A8I3S701_CANLF	PSAVPK	TEDQRPQLDPYQILGPTSSRLANPGSGQIQLWQF	LLELLSDSSNSNCITWEGTN		292
tr	A0A8I3PZU9	A0A8I3PZU9_CANLF	PSAVPK	TEDQRPQLDPYQILGPTSSRLANPGSGQIQLWQF	LLELLSDSSNSNCITWEGTN		320
tr	A0A8I3PZR0	A0A8I3PZR0_CANLF	PSAVPK	TEDQRPQLDPYQILGPTSSRLANPGSGQIQLWQF	LLELLSDSSNSNCITWEGTN		336
tr	A0A8I3S712	A0A8I3S712_CANLF	PSAVPK	TEDQRPQLDPYQILGPTSSRLANPGSGQIQLWQF	LLELLSDSSNSNCITWEGTN		360
tr	A0A8I3SC08	A0A8I3SC08_CANLF	PSAVPK	TEDQRPQLDPYQILGPTSSRLANPGSGQIQLWQF	LLELLSDSSNSNCITWEGTN		319
tr	A0A8I3Q0I1	A0A8I3Q0I1_CANLF	PSAVPK	TEDQRPQLDPYQILGPTSSRLANPGSGQIQLWQF	LLELLSDSSNSNCITWEGTN		312
			*****				

tr	A0A8I3Q0M2	A0A8I3Q0M2_CANLF	GEFKMTDPDEVARRWGERKSKPNMNYDKLSRALRYYYDKNIMTKVHGKRYAYKDFDHGIA	376
tr	A0A8I3S701	A0A8I3S701_CANLF	GEFKMTDPDEVARRWGERKSKPNMNYDKLSRALRYYYDKNIMTKVHGKRYAYKDFDHGIA	352
tr	A0A8I3PZU9	A0A8I3PZU9_CANLF	GEFKMTDPDEVARRWGERKSKPNMNYDKLSRALRYYYDKNIMTKVHGKRYAYKDFDHGIA	380
tr	A0A8I3PZR0	A0A8I3PZR0_CANLF	GEFKMTDPDEVARRWGERKSKPNMNYDKLSRALRYYYDKNIMTKVHGKRYAYKDFDHGIA	396
tr	A0A8I3S712	A0A8I3S712_CANLF	GEFKMTDPDEVARRWGERKSKPNMNYDKLSRALRYYYDKNIMTKVHGKRYAYKDFDHGIA	420
tr	A0A8I3SC08	A0A8I3SC08_CANLF	GEFKMTDPDEVARRWGERKSKPNMNYDKLSRALRYYYDKNIMTKVHGKRYAYKDFDHGIA	379
tr	A0A8I3Q0I1	A0A8I3Q0I1_CANLF	GEFKMTDPDEVARRWGERKSKPNMNYDKLSRALRYYYDKNIMTKVHGKRYAYKDFDHGIA	372
*****				
tr	A0A8I3Q0M2	A0A8I3Q0M2_CANLF	QALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMNFBVAPHPALPVTSSSFFAAPNPYWNSP	436
tr	A0A8I3S701	A0A8I3S701_CANLF	QALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMNFBVAPHPALPVTSSSFFAAPNPYWNSP	412
tr	A0A8I3PZU9	A0A8I3PZU9_CANLF	QALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMNFBVAPHPALPVTSSSFFAAPNPYWNSP	440
tr	A0A8I3PZR0	A0A8I3PZR0_CANLF	QALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMNFBVAPHPALPVTSSSFFAAPNPYWNSP	456
tr	A0A8I3S712	A0A8I3S712_CANLF	QALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMNFBVAPHPALPVTSSSFFAAPNPYWNSP	480
tr	A0A8I3SC08	A0A8I3SC08_CANLF	QALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMNFBVAPHPALPVTSSSFFAAPNPYWNSP	439
tr	A0A8I3Q0I1	A0A8I3Q0I1_CANLF	QALQPHPESSLYKYPSDLPYMGSYHAHPQKMNFBVAPHPALPVTSSSFFAAPNPYWNSP	432
*****				
tr	A0A8I3Q0M2	A0A8I3Q0M2_CANLF	TGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYY	459
tr	A0A8I3S701	A0A8I3S701_CANLF	TGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYY	435
tr	A0A8I3PZU9	A0A8I3PZU9_CANLF	TGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYY	463
tr	A0A8I3PZR0	A0A8I3PZR0_CANLF	TGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYY	479
tr	A0A8I3S712	A0A8I3S712_CANLF	TGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYY	503
tr	A0A8I3SC08	A0A8I3SC08_CANLF	TGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYY	462
tr	A0A8I3Q0I1	A0A8I3Q0I1_CANLF	TGGIYPNTRLPASHMPSHLGTYY	455
*****				

## Annexe 6 : Résultats des immunomarquages ERG et CD31 des tumeurs vasculaires spléniques

Le numéro du cas correspond à celui indiqué dans la base de données du laboratoire. Le tableau est poursuivi sur la page suivante. Toutes les lames étaient associées à des témoins négatif et positif valides, sauf lors d'indication contraire.

Numéro du cas	Numéro de bloc	Diagnostic histologique	Marquage ERG des cellules tumorales	Marquage CD31 des cellules tumorales
HIS11-1551	1	Hémangiome	+++	0
HIS14-1948	3	Hémangiome	+++	0
HIS16-0827	1	Hémangiome	+	+++
HIS16-0934	1	Hémangiome	++	++
HIS19-0521	3	Hémangiome	+++	+++
HIS14-0704	1	Hémangiosarcome	+++	+
	3		+++	N.R
HIS14-1062	2	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS14-1446	2	Hémangiosarcome	+++	+
HIS14-1820	1	Hémangiosarcome	+++	N.R
	2		+++	+
HIS14-1920	1	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS14-1957	1	Hémangiosarcome	+	+++
HIS14-2063	B	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS15-0004	1	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS15-0218	A	Hémangiosarcome	+++	+
HIS15-1063	1	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS15-1165	/	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS15-1368	1	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS15-1684	3	Hémangiosarcome	++	++
HIS15-1782	1	Hémangiosarcome	+++	0
HIS16-0011	1	Hémangiosarcome	+++	0
HIS16-0389	4	Hémangiosarcome	+++	+
HIS16-0855	2	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS16-0871	2	Hémangiosarcome	+++	++
HIS16-0893	1	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS16-0985	3	Hémangiosarcome	+++	++
HIS16-1421	/	Hémangiosarcome	+++	Absence de témoin positif
HIS16-1518	3	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS17-0551	1	Hémangiosarcome	++	+++
HIS17-0758	1	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS17-1209	1	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS17-1523	1	Hémangiosarcome	+++	++
HIS17-1597	1	Hémangiosarcome	+++	+++

HIS17-1612	2	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS17-1629	1	Hémangiosarcome	+++	N.R
	2		+++	+++
HIS17-1651	3	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS18-0021	2	Hémangiosarcome	++	+++
	3		+++	N.R
HIS18-0914	1	Hémangiosarcome	+++	+
HIS18-0952	/	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS18-1008	1	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS18-1009	1	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS18-1172	1	Hémangiosarcome	+++	++
	2		+++	N.R
HIS18-1280	1	Hémangiosarcome	+++	+
HIS18-1474	3	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS18-1497	4	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS19-0166	1	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS19-0220	3	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS19-0293	1	Hémangiosarcome	+++	+++
	2		+++	+++
HIS19-0508	1	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS19-0598	1	Hémangiosarcome	+++	++
HIS19-0617	1	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS19-0706	2	Hémangiosarcome	+++	Absence de témoin positif
HIS19-0837	1	Hémangiosarcome	+++	Absence de témoin positif
	2		+++	Absence de témoin positif
HIS19-0845	1	Hémangiosarcome	+++	++
HIS19-0896	2	Hémangiosarcome	++	+
HIS19-1190	3	Hémangiosarcome	+++	0
HIS19-1351	2	Hémangiosarcome	++	+++
HIS19-1516	3	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS19-1669	/	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS20-0464	1	Hémangiosarcome	++	+++
HIS20-0652	3	Hémangiosarcome	+++	+++
HIS20-0813	2	Hémangiosarcome	+++	N.R
HIS20-0953	2	Hémangiosarcome	++	++
HIS20-0954	1	Hémangiosarcome	+++	+++
	2		+++	N.R
HIS20-1153	1	Hémangiosarcome	+	+++
	2		+++	+++
HIS21-0163	1	Hémangiosarcome	+++	0

Légende : / : un seul bloc existait pour le cas ; N.R : non réalisé ; 0 : marquage négatif ; + : positif d'intensité faible ; ++ : positif d'intensité moyenne ; +++ : positif d'intensité forte

## Annexe 7 : Résultats des immunomarquages ERG et CD31 des tumeurs initialement diagnostiquées tumeurs stromales spléniques

Le numéro du cas correspond à celui indiqué dans la base de données du LAPVSO. Le tableau est poursuivi sur les pages suivantes. Toutes les lames étaient associées à des témoins négatif et positif valides, sauf lors d'indication contraire.

Numéro du cas	Numéro de bloc	Diagnostic histologique initial	Marquage ERG des cellules tumorales	Marquage CD31 des cellules tumorales
2274-17	/	Sarcome à cellules fusiformes de haut grade, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
2455-17	/	Sarcome à cellules fusiformes de haut grade, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
3144-17	3	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
3687-17	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
7576-17	/	Sarcome à cellules fusiformes de haut grade, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
9319-17	/	Sarcome de haut grade, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
10712-17	2	Sarcome de haut grade, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
12703-17	1	Sarcome à cellules fusiformes de bas grade, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
18048-17	/	Sarcome à cellules fusiformes, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
21025-17	2	Sarcome à cellules fusiformes de haut grade, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
23142-17	3	Sarcome de haut grade, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
24056-17	1	Sarcome de haut grade, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
28770-17	1	Sarcome de haut grade, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
29084-17	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
30583-17	1	Sarcome de haut grade, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
2288-18	3	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
2637-18	1	Sarcome des tissus mous compatible avec un hémangiopéricytome	0	N.R
2754-18	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
5509-18	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R

5512-18	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
5855-18	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
7884-18	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	0
9379-18	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
12237-18	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
13864-18	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
15523-18	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
16028-18	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
17341-18	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
17501-18	3	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
17981-18	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
23005-18	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
27271-18	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
28262-18	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
32156-18	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
33092-18	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
33315-18	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
33370-18	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
35368-18	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
2662-19	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
3655-19	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
4865-19	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
7949-19	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
9200-19	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
9436-19	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	++	+++
10306-19	3	Sarcome de haut grade, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
11882-19	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
12252-19	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
13113-19	2	Sarcome à cellules fusiformes, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
14038-19	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
14086-19	2	Sarcome de bas grade, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
17614-19	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
18444-19	/	Sarcome à cellules fusiformes, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
18672-19	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
18981-19	3	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
19946-19	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
24334-19	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
24365-19	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
24506-19	4	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
24442-19	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	Absence de témoin positif	N.R

	2		0	N.R
26973-19	3	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
29417-19	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
33163-19	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
1089-20	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
5899-20	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	Absence de témoin positif	N.R
10108-20	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
11707-20	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
14937-20	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
16619-20	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
18866-20	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
22385-20	4	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
29193-20	1	Sarcome à cellules fusiformes, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
32998-20	1	Sarcome à cellules fusiformes, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
	2		0	N.R
35365-20	2	Sarcome à cellules fusiformes, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
35791-20	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
33796-20	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
36432-20	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
3244-21	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
4060-21	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	+++	0
4411-21	1	Sarcome à cellules fusiformes, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
6234-21	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
6592-21	3	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
8599-21	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
9277-21	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
12172-21	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
14208-21	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
14652-21	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
17582-21	3	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
18218-21	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
19659-21	3	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
19846-21	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
22404-21	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
23327-21	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
25162-21	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
25620-21	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
26698-21	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
28127-21	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
28478-21	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
28633-21	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R

30551-21	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
	3		0	N.R
30609-21	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
31749-21	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
32134-21	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	+++	++
32437-21	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
32783-21	4	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
32944-21	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
33174-21	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
34714-21	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
35922-21	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
36293-21	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
37521-21	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
37864-21	3	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
38261-21	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
39641-21	1	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
43077-21	2	Sarcome à cellules fusiformes de haut grade, non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
44080-21	3	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R
2091-22	/	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	+++	0
11424-22	2	Sarcome non vasculaire, non lymphoïde	0	N.R

*Légende : / : un seul bloc existait pour le cas ; N.R : non réalisé ; 0 : marquage négatif ; + : positif d'intensité faible ; ++ : positif d'intensité moyenne ; +++ : positif d'intensité forte*

## Annexe 8 : Résultats des immunomarquages ERG et CD31 des tumeurs spléniques rares ou particulières

Le numéro du cas correspond à celui indiqué dans la base de données du laboratoire. Toutes les lames étaient associées à des témoins négatif et positif valides, sauf lors d'indication contraire.

Numéro du cas	Numéro de bloc	Diagnostic histologique initial	Marquage ERG des cellules tumorales	Marquage CD31 des cellules tumorales
HIS14-0506	2	Leucémie aiguë à mégacaryoblastes	Non interprétable car marquage cytoplasmique du témoin positif	0
HIS14-1300	3	Léiomyosarcome	0	N.R
HIS14-2098	c	Sarcome histiocytaire	+++	+++
HIS15-0829	1	Sarcome histiocytaire	Absence de témoin positif	0
HIS15-1455	4	Carcinome	0	0
HIS16-0705	4	Sarcome histiocytaire	0	0
HIS16-1209	1	Lymphangiome	+++	0
HIS16-1320	4	Schwannome malin	0	N.R
HIS16-1411	1	Carcinome anaplasique à cellules fusiformes	0	0
	2		0	0
HIS17-0240	2	Ostéosarcome tégangiectasique	+++	N.R
	3		+++	+++
HIS17-0367	1	Tumeur à cellules fusiformes + infiltration de carcinome anaplasique	0	N.R
HIS17-0854	2	Mastocytome de haut grade	++	Absence de témoin positif
HIS17-1356	1b	Lymphome B	++	0
HIS17-1521	1	Sarcome à cellules dendritiques	0	0
HIS17-1588	1	Mastocytome	++	0
HIS18-1162	2	Sarcome des cellules réticulées	0	0
HIS18-1297	3	Lymphome T de haut grade	++	0
HIS18-1399	1	Sarcome à cellules dendritiques	0	N.R

Légende : N.R : non réalisé ; 0 : marquage négatif ; + : positif d'intensité faible ; ++ : positif d'intensité moyenne ; +++ : positif d'intensité forte



# UTILISATION D'UN ANTICORPS ANTI-ERG DANS LE DIAGNOSTIC HISTOLOGIQUE DES TUMEURS VASCULAIRES SPLÉNIQUES CHEZ LE CHIEN : APPLICATION AUX TUMEURS À CELLULES FUSIFORMES

---

Auteur

---

KLEIN Césarine

## Résumé

---

Les hémangiosarcomes spléniques sont fréquents et de mauvais pronostic chez le chien. Leur diagnostic nécessite un examen histologique de la tumeur, mais cette technique peut être insuffisante, notamment si l'organisation architecturale ou la morphologie des cellules tumorales sont ambiguës. Dans ce cas, l'immunohistochimie peut permettre de préciser le diagnostic. À ce jour, le marqueur CD31 est le plus adapté pour mettre en évidence les cellules endothéliales tumorales chez le chien, mais sa sensibilité et sa spécificité ne sont pas idéales. Chez l'Homme, le facteur de transcription ERG est utilisé pour identifier les angiosarcomes. L'objectif de cette thèse était d'évaluer la sensibilité et la spécificité d'un anticorps anti-ERG pour l'identification des tumeurs endothéliales spléniques canines, et de les comparer à celles d'un anticorps anti-CD31. L'étude immunohistochimique de 65 tumeurs vasculaires spléniques a montré une sensibilité de 100 % pour le marquage ERG, et 90 % pour CD31. Le marquage de 117 tumeurs spléniques diagnostiquées comme tumeurs stromales a montré quatre tumeurs ERG-positives, dont deux ont finalement été recatégorisées en hémangiosarcomes. Ceci montre que le marquage ERG est plutôt spécifique des tumeurs endothéliales et qu'il permet de détecter des hémangiosarcomes même peu différenciés. L'immunomarquage d'autres types de tumeurs spléniques a révélé que ERG est également présent dans les lymphomes (2/2) et les mastocytomes (2/2). En conclusion, les résultats obtenus valident l'utilisation du marqueur ERG pour le diagnostic des tumeurs vasculaires spléniques canines. En outre, il offre une complémentarité intéressante à CD31.

## Mots-clés

---

Chien, Tumeur, Hémangiosarcome, Rate, Diagnostic, Immunohistochimie, ERG, CD31

## Jury

---

Président du jury : Pr **DARGAUD Yesim**  
1er assesseur : Pr **MARCHAL Thierry**  
2ème assesseur : Pr **PONCE Frédérique**  
Membre invité : Mme **MILHAU Nadège**