

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTÉS DE MÉDECINE

ANNÉE 2016

2016 TOU3 1538

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE
MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE

Présentée et soutenue publiquement

par

Claire ILLAC-VAUQUELIN

le 15 juin 2016

IMPLICATION DE LA VOIE SPHINGOSINE KINASE 1 / SPHINGOSINE
1-PHOSPHATE DANS L'HYPOXIE INTRATUMORALE DES
OSTEOSARCOMES

Directrice de thèse : Pr Anne GOMEZ-BROUCHET

JURY

Madame le Professeur Emmanuelle URO-COSTE	Président
Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET	Assesseur
Madame le Professeur Anne GOMEZ-BROUCHET	Assesseur
Monsieur le Professeur Paul BONNEVIALLE	Assesseur
Madame le Docteur Christine CHEVREAU	Suppléant
Monsieur le Docteur Olivier CUVILLIER	Membre invité

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTÉS DE MÉDECINE

ANNÉE 2016

2016 TOU3 1538

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE
MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE

Présentée et soutenue publiquement

par

Claire ILLAC-VAUQUELIN

le 15 juin 2016

IMPLICATION DE LA VOIE SPHINGOSINE KINASE 1 / SPHINGOSINE
1-PHOSPHATE DANS L'HYPOXIE INTRATUMORALE DES
OSTEOSARCOMES

Directrice de thèse : Pr Anne GOMEZ-BROUCHET

JURY

Madame le Professeur Emmanuelle URO-COSTE	Président
Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET	Assesseur
Madame le Professeur Anne GOMEZ-BROUCHET	Assesseur
Monsieur le Professeur Paul BONNEVIALLE	Assesseur
Madame le Docteur Christine CHEVREAU	Suppléant
Monsieur le Docteur Olivier CUVILLIER	Membre invité



FACULTÉ DE MÉDECINE PURPAN

TABLEAU du PERSONNEL HU
des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} septembre 2015

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. ROUGE D.	Professeur Honoraire	M. BARTHE
Doyen Honoraire	M. LAZORTES Y.	Professeur Honoraire	M. CABARROT
Doyen Honoraire	M. CHAP H.	Professeur Honoraire	M. DUFFAUT
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL B	Professeur Honoraire	M. ESCAT
Doyen Honoraire	M. PUEL P.	Professeur Honoraire	M. ESCANDE
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE	Professeur Honoraire	M. PRIS
Professeur Honoraire	Mme ENJALBERT	Professeur Honoraire	M. CATHALA
Professeur Honoraire	M. GEDEON	Professeur Honoraire	M. BAZEX
Professeur Honoraire	M. PASQUIE	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE
Professeur Honoraire	M. RIBAUT	Professeur Honoraire	M. CARLES
Professeur Honoraire	M. ARLET J.	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ
Professeur Honoraire	M. RIBET	Professeur Honoraire	M. VAYSSE
Professeur Honoraire	M. MONROZIES	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE
Professeur Honoraire	M. DALOUS	Professeur Honoraire	M. GUITARD
Professeur Honoraire	M. DUPRE	Professeur Honoraire	M. LAZORTES F.
Professeur Honoraire	M. FABRE J.	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE
Professeur Honoraire	M. DUCOS	Professeur Honoraire	M. CERENE
Professeur Honoraire	M. LACOMME	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL
Professeur Honoraire	M. COTONAT	Professeur Honoraire	M. HOFF
Professeur Honoraire	M. DAVID	Professeur Honoraire	M. REME
Professeur Honoraire	Mme DIDIER	Professeur Honoraire	M. FAUVEL
Professeur Honoraire	Mme LARENG M.B.	Professeur Honoraire	M. FREXINOS
Professeur Honoraire	M. BES	Professeur Honoraire	M. CARRIERE
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. MANSAT M.
Professeur Honoraire	M. REGNIER	Professeur Honoraire	M. BARRET
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	M. REGIS	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT
Professeur Honoraire	M. ARBUS	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC
Professeur Honoraire	M. PUJOL	Professeur Honoraire	M. DELSOL
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI	Professeur Honoraire	M. ABBAL
Professeur Honoraire	M. RUMEAU	Professeur Honoraire	M. DURAND
Professeur Honoraire	M. BESOMBES	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHVEITZER
Professeur Honoraire	M. SUC	Professeur Honoraire	M. RAILHAC
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE	Professeur Honoraire	M. POURRAT
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURS	Professeur Honoraire	M. QUERLEU D.
Professeur Honoraire	M. CARTON	Professeur Honoraire	M. ARNE JL
Professeur Honoraire	Mme PUEL J.	Professeur Honoraire	M. ESCOURROU J.
Professeur Honoraire	M. GOUZI	Professeur Honoraire	M. FOURTANIER G.
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE J.
Professeur Honoraire	M. PASCAL	Professeur Honoraire	M. PESSEY JJ.
Professeur Honoraire	M. SALVADOR M.	Professeur Honoraire	M. CHAVOIN JP
Professeur Honoraire	M. BAYARD	Professeur Honoraire	M. GERAUD G.
Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE	Professeur Honoraire	M. PLANTE P.
Professeur Honoraire	M. FABIÉ	Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL JF

Professeurs Émérites

Professeur ALBAREDE	Professeur JL. ADER
Professeur CONTÉ	Professeur Y. LAZORTES
Professeur MURAT	Professeur L. LARENG
Professeur MANELFE	Professeur F. JOFFRE
Professeur LOUVET	Professeur B. BONEU
Professeur SARRAMON	Professeur H. DABERNAT
Professeur CARATERO	Professeur M. BOCCALON
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL	Professeur B. MAZIERES
Professeur COSTAGLIOLA	Professeur E. ARLET-SUAU
	Professeur J. SIMON

P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ADOUE Daniel	Médecine Interne, Gériatrie
M. AMAR Jacques	Thérapeutique
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie
M. AVET-LOISEAU Hervé	Hématologie, transfusion
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie
M. BLANCHER Antoine	Immunologie (option Biologique)
M. BONNEVIALLE Paul	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.
M. BOSSAVY Jean-Pierre	Chirurgie Vasculaire
M. BRASSAT David	Neurologie
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique
M. BUGAT Roland (C.E)	Cancérologie
M. CARRIE Didier	Cardiologie
M. CHAP Hugues (C.E)	Biochimie
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie
M. CLANET Michel (C.E)	Neurologie
M. DAHAN Marcel (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DEGUINE Olivier	Oto-rhino-laryngologie
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie
M. FERRIERES Jean	Epidémiologie, Santé Publique
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie
M. FRAYSSE Bernard (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie
Mme LAMANT Laurence	Anatomie Pathologique
M. LANG Thierry	Bio-statistique Informatique Médicale
M. LANGIN Dominique	Nutrition
M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine Interne
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie
M. MALAVAUD Bernard	Urologie
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique
M. MARCHOU Bruno	Maladies Infectieuses
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique
M. MONROZIES Xavier	Gynécologie Obstétrique
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie
M. MOSCOVICI Jacques	Anatomie et Chirurgie Pédiatrique
Mme MOYAL Elisabeth	Cancérologie
Mme NOURHASHEMI Fatemeh	Gériatrie
M. OLIVES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie
M. OSWALD Eric	Bactériologie-Virologie
M. PARINAUD Jean	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.
M. PAUL Carle	Dermatologie
M. PAYOUX Pierre	Biophysique
M. PERRET Bertrand (C.E)	Biochimie
M. PRADERE Bernard (C.E)	Chirurgie générale
M. RASCOL Olivier	Pharmacologie
M. RECHER Christian	Hématologie
M. RISCHMANN Pascal (C.E)	Urologie
M. RIVIERE Daniel (C.E)	Physiologie
M. SALES DE GAUZY Jérôme	Chirurgie Infantile
M. SALLES Jean-Pierre	Pédiatrie
M. SANS Nicolas	Radiologie
M. SERRE Guy (C.E)	Biologie Cellulaire
M. TELMON Norbert	Médecine Légale
M. VINEL Jean-Pierre (C.E)	Hépatogastro-entérologie

P.U. - P.H.

2ème classe

Mme BEYNE-RAUZY Odile	Médecine Interne
M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. BUREAU Christophe	Hépatogastro-entéro
M. CALVAS Patrick	Génétique
M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale
Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
M. CHAIX Yves	Pédiatrie
Mme CHARPENTIER Sandrine	Thérapeutique, méd. d'urgence, addict
M. COGNARD Christophe	Neuroradiologie
M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct.
M. FOURNIE Bernard	Rhumatologie
M. FOURNIÉ Pierre	Ophthalmologie
M. GAME Xavier	Urologie
M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation
Mme GENESTAL Michèle	Réanimation Médicale
M. LAROCHE Michel	Rhumatologie
M. LAUWERS Frédéric	Anatomie
M. LEOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. MAZIERES Julien	Pneumologie
M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
M. PARANT Olivier	Gynécologie Obstétrique
M. PARIENTE Jérémie	Neurologie
M. PATHAK Atul	Pharmacologie
M. PAYRASTRE Bernard	Hématologie
M. PERON Jean-Marie	Hépatogastro-entérologie
M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
Mme SAVAGNER Frédérique	Biochimie et biologie moléculaire
Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques
M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie

P.U.

M. OUSTRIC Stéphane	Médecine Générale
---------------------	-------------------

P.U. - P.H.
Classe Exceptionnelle et 1ère classe

P.U. - P.H.
2ème classe

M. ACAR Philippe	Pédiatrie
M. ALRIC Laurent	Médecine Interne
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie
M. ARLET Philippe (C.E)	Médecine Interne
M. ARNAL Jean-François	Physiologie
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique
M. BOUTAULT Franck (C.E)	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie
M. BUJAN Louis	Urologie-Andrologie
M. BUSCAIL Louis	Hépatogastro-Entérologie
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie
M. CARON Philippe (C.E)	Endocrinologie
M. CHAMONTIN Bernard (C.E)	Thérapeutique
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie
M. COURBON Frédéric	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologie
M. DELABESSE Eric	Hématologie
Mme DELISLE Marie-Bernadette (C.E)	Anatomie Pathologie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie
M. GALINIER Michel	Cardiologie
M. GLOCK Yves	Chirurgie Cardio-Vasculaire
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie
M. GRAND Alain (C.E)	Epidémiologie. Eco. de la Santé et Prévention
M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis	Chirurgie plastique
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie
Mme HANAIRE Hélène (C.E)	Endocrinologie
M. KAMAR Nassim	Néphrologie
M. LARRUE Vincent	Neurologie
M. LAURENT Guy (C.E)	Hématologie
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie
M. MALECAZE François (C.E)	Ophtalmologie
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation
Mme MARTY Nicole	Bactériologie Virologie Hygiène
M. MASSIP Patrice (C.E)	Maladies Infectieuses
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile
M. RITZ Patrick	Nutrition
M. ROCHE Henri (C.E)	Cancérologie
M. ROLLAND Yves	Gériatrie
M. ROSTAING Lionel (C.E)	Néphrologie
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie
M. SALVAYRE Robert (C.E)	Biochimie
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD Jean-Michel	Pharmacologie
M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. SOULAT Jean-Marc	Médecine du Travail
M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie
M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie
M. VAYSSIERE Christophe	Gynécologie Obstétrique
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie

M. ACCADBLE Franck	Chirurgie Infantile
M. ARBUS Christophe	Psychiatrie
M. BERRY Antoine	Parasitologie
M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie
M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire
M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire
M. CHAYNES Patrick	Anatomie
M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses
M. DELORD Jean-Pierre	Cancérologie
Mme DULY-BOUHANICK Béatrice	Thérapeutique
M. FRANCHITTO Nicolas	Toxicologie
M. GALINIER Philippe	Chirurgie Infantile
M. GARRIDO-STOWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique
M. HUYGHE Eric	Urologie
M. LAFOSSE Jean-Michel	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. LEGUEVAQUE Pierre	Chirurgie Générale et Gynécologique
M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
Mme MAZEREJEW Juliette	Dermatologie
M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation
M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
M. OTAL Philippe	Radiologie
M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie
M. SAILLER Laurent	Médecine Interne
M. TACK Ivan	Physiologie
Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique
M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie

M.C.U. - P.H.		M.C.U. - P.H.	
M. APOIL Pol Andre	Immunologie	Mme ABRAVANEL Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie	M. BES Jean-Claude	Histologie - Embryologie
M. BIETH Eric	Génétique	M. CMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme BONGARD Vanina	Epidémiologie	Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition	Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie	Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
Mme CONCINA Dominique	Anesthésie-Réanimation	Mme CAUSSE Elisabeth	Biochimie
M. CONGY Nicolas	Immunologie	M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
Mme COURBON Christine	Pharmacologie	M. CHASSAING Nicolas	Génétique
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie	Mme CLAVE Danielle	Bactériologie Virologie
Mme de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie	M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme DE MAS Véronique	Hématologie	Mme COLLIN Laetitia	Cytologie
Mme DELMAS Catherine	Bactériologie Virologie Hygiène	M. CORRE Jill	Hématologie
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène	M. DEDOIT Fabrice	Médecine Légale
Mme DUGUET Anne-Marie	Médecine Légale	M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. DUPUI Philippe	Physiologie	M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie	M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie	Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
M. GANTET Pierre	Biophysique	Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie	Mme GALINIER Anne	Nutrition
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire	Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. HAMDJ Safouane	Biochimie	M. GASQ David	Physiologie
Mme HITZEL Anne	Biophysique	Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie	Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
M. JALBERT Florian	Stomatologie et Maxillo-Faciale	Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire	M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale	Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie	M. LAHARRAGUE Patrick	Hématologie
M. LAURENT Camille	Anatomie Pathologique	M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
Mme LE TINNIER Anne	Médecine du Travail	Mme LAPRIE Anne	Cancérologie
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie	M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LOPEZ Raphael	Anatomie	Mme LEOBON Céline	Cytologie et histologie
Mme MONTASTIER Emilie	Nutrition	M. LEPAGE Benoit	Bio-statistique
M. MONTOYA Richard	Physiologie	Mme MAUPAS Françoise	Biochimie
Mme MOREAU Marion	Physiologie	M. MIEUSSET Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire	Mme NASR Nathalie	Neurologie
M. PILLARD Fabien	Physiologie	Mme PERIQUET Brigitte	Nutrition
Mme PRERE Marie-Françoise	Bactériologie Virologie	Mme PRADDAUDE Françoise	Physiologie
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie	M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
Mme RAGAB Janie	Biochimie	M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène	Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme SABOURDY Frédéricque	Biochimie	M. TKACZUK Jean	Immunologie
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie	Mme VALLET Marion	Physiologie
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation	Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie
M. SOLER Vincent	Ophthalmologie		
M. TAFANI Jean-André	Biophysique		
M. TREINER Emmanuel	Immunologie		
Mme TREMOLLIERS Florence	Biologie du développement		
M. TRICOIRE Jean-Louis	Anatomie et Chirurgie Orthopédique	M. BISMUTH Serge	Médecine Générale
M. VINCENT Christian	Biologie Cellulaire	Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve	Médecine Générale
		Mme ESCOURROU Brigitte	Médecine Générale
			M.C.U.

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr BRILLAC Thierry
Dr ABITTEBOUL Yves
Dr CHICOULAA Bruno
Dr IRI-DELAHAYE Motoko

Dr BISMUTH Michel
Dr BOYER Pierre
Dr ANE Serge

A notre Présidente du jury,

Madame le Professeur Emmanuelle URO-COSTE

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie

Tu nous fais l'honneur et le plaisir de présider ce jury de thèse.

Nous avons eu le privilège de bénéficier de ton enseignement et de ton expérience tout au long de notre internat. Nous admirons l'étendue de tes connaissances, ta rigueur scientifique, ta pédagogie, ainsi que ta disponibilité et ta gentillesse.

Nous t'en remercions et te prions de trouver ici l'expression de notre gratitude et de notre profond respect. Nous espérons honorer la confiance que tu nous accordes.

A notre jury de thèse,

Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie

Nous sommes heureuses et honorées de vous compter parmi les membres du jury. Votre expertise diagnostique et scientifique ainsi que vos qualités d'enseignant sont un modèle pour nous. Vous nous faites l'honneur de nous accueillir dans votre service dans quelques mois et nous espérons nous montrer dignes de la confiance que vous nous accordez.

Veillez trouver ici l'expression de notre profond respect et de notre sincère reconnaissance.

A notre directrice de thèse,

Madame le Professeur Anne GOMEZ-BROUCHET

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie

Tu nous as fait l'honneur de nous proposer ce travail de thèse et de le diriger. Nous t'en remercions et espérons être digne de la confiance dont tu nous honores.

Nous te sommes reconnaissantes de nous avoir accompagnées tout au long de notre internat, depuis le premier cas clinique jusqu'à la thèse, en passant par le master 2. Nous admirons tes qualités professionnelles, ta capacité à mener de front autant de projets, mais aussi tes qualités humaines. Nous te remercions pour ta gentillesse, ta confiance et tes précieux conseils. Apprendre à tes côtés a toujours été un plaisir.

A notre jury de thèse,

Monsieur le Professeur Paul BONNEVIALLE

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Chirurgie orthopédique

Nous n'avons pas eu l'honneur de travailler dans votre service, mais nous connaissons et admirons vos qualités professionnelles. Vous nous faites l'honneur et le plaisir d'accepter de siéger dans ce jury de thèse et nous vous en remercions.

Soyez assuré de notre plus grand respect.

A notre jury de thèse,

Madame le Docteur Christine CHEVREAU

Praticien spécialiste de Centre de Lutte Contre le Cancer
Oncologie médicale

Vous nous faites l'honneur et le plaisir de siéger à ce jury de thèse et nous vous en remercions. Nous n'avons pas eu l'honneur de travailler dans votre service, mais nous connaissons et nous admirons votre implication auprès des malades.

Soyez assurée de notre plus grand respect.

A notre jury de thèse,

Monsieur le Docteur Olivier CUVILLIER

Docteur ès sciences - Directeur de recherche

Vous nous faites l'honneur et le plaisir de siéger à ce jury de thèse.

Nous admirons l'étendue de vos connaissances et votre rigueur scientifique. Nous vous sommes reconnaissantes de nous avoir accueillies dans votre équipe de recherche lors du master 2 recherche.

Soyez assuré de notre plus grand respect.

Je souhaite remercier tout particulièrement les personnes qui m'ont aidée au cours de ce travail :

Adeline Ledoux, en particulier pour le dosage de l'activité de la SphK1,

Christelle, Falek, Sophie P, Najat, grâce à qui j'ai appris les bases de l'immunohistochimie et à me servir d'un microtome, et pour la gestion de la tumorothèque.

Serge, Yvan et François-Xavier, pour les lames scannées.

Merci à tous ceux qui m'entourent et ont toujours été là, la liste n'est pas exhaustive !

A l'ensemble du service d'anapath de l'YUC

A tous les médecins qui m'ont beaucoup appris, pour votre enseignement, votre disponibilité et votre patience depuis mon arrivée en anapath, il y a 6 ans déjà (presque 7 !)

Éliane, merci pour ta disponibilité et ta bienveillance. Je suis très touchée de ta confiance, et j'espère en être digne... Apprendre la gynécopathologie à tes côtés est un grand honneur. J'espère que tu apprécieras l'expérience chinoise... Mais n'oublie pas de revenir !

Philippe, on est mal ramirette ! Sophie L, Véronique, Raphaëlle, je risque de venir souvent toquer à votre porte... Isabelle D et Camille L, j'ai commencé l'anapath avec vous, Marie-Laure, Magali C, Laurence, Janick, Jacqueline, Marie, Béatrice, Emilie, Florence, Isabelle R, Dominique, Monique, Solène, Céline B, Chantal, Martine, Nada, Joëlle et Pomone, merci à tou(te)s !

Mme Delisle, je vous remercie pour votre enseignement et votre soutien pour le master2.

Et à ceux qui ont quitté le service mais dont j'ai pu bénéficier de l'enseignement, M. Delso, Mme Escourrou, Magali L, Céline G, Laetitia, Virginie, Caroline et Fabrice.

A Cathy, tu nous manques.

A mes cointernes d'anapath :

Les anciens co-internes devenus chefs

Audrey, merci pour ton amitié, ton soutien en toutes circonstances et tes nombreux conseils toujours pleins de bon sens !

Romain, d'abord coexternes, on a pris notre temps chacun notre tour, mais on va finir par y arriver à être co-chefs !

Maxime, tu as participé à ce travail, merci pour ton recueil des données des ostéosarcomes de la mandibule !

Thibaut, on n'a pas eu l'occasion d'être co-interne, dommage.

Les cointernes actuels

Julie, co-interne, co-thésarde et dans quelques mois co-chef ! Courage, c'est bientôt fini, et après l'effort, le réconfort !

Camille F, qui a réussi à me convaincre que faire Marseille-Cassis avec seulement 3 mois d'entraînement, ce serait facile : on en reparle dans quelques mois ?

*Anne-Charlotte, tes éclats de rire nous manquent,
Laure, heureusement que tu es là pour veiller à la bonne organisation des internes,
Gwendoline, une présentation imprévue en anglais dans 30 minutes ? Même pas peur !*

Sarah, bravo pour la bourse, maintenant y'a plus qu'à !

Aurore, bon courage pour le master2, tu n'auras bientôt plus que le plaisir des manips,

Alix, discrète mais efficace,

Cécile, toujours zen,

Claire R., toujours de bonne humeur,

Sébastien et Quentin, vous êtes de nouveau en minorité les mecs !

Charlotte, on dirait que tu es en anapath depuis toujours !

Gabrielle, Justine et Lisa, bienvenue en anapath !

Nicolas, merci pour ton aide pour l'IRM.

Lise, Marine et Pierre-Olivier, j'espère que vous trouverez vite votre voie.

Et tous ceux que j'ai croisés lors d'un détour en anapath : Cécile G, Delphine, Mickaël, Romulus, Aïchatou, Laureline, Gauthier, Claire U, Juliette, Noëlle, David, Oubada, Baptiste, Nouritza, Ephraïm, Linda.

Et mes anciens cointernes d'anapath : Youri et Claire, qui m'a formée à la macro.

A tous les techniciens du service, Virginie (merci pour les pancakes !), Aurélia (qui a toujours un temps d'avance), Anaïs, Marie, Marylène, Gisèle, Michèle, Chantal S, Chantal C, Brigitte, Guylaine, Nicolas, Benjamin, Marion, Marjorie, Thomas, Julien, Charley, Sophie D, Sophie L, Mireille, Evelyne, Gabrielle, Isabelle, Armelle, Mélanie, Justine, Jessica, Dévy, Laura, Sylvie, Laurence, Audray, Cécile, Céline, Emma, Danièle, Véronique, Marie-Christine, Elodie, Flavien, Emilie, Anne, Maryse, Arielle, Marie-Christine, Charlene, Christelle, Aurore, Angélique, Lucie, Novela, Nathalie, Nadine, Stéphanie, Alix et Adrian : merci pour les bons moments à la macro, votre aide, votre disponibilité et votre gentillesse, et bien sûr pour tous les petits dej', les gâteaux, les crêpes, les chocos,... !!!

A toutes les secrétaires, Marie-Jo, Sandrine, Virginie, Pascale, Yolande, Dounia, Hélène, Marie-France, et Delphine, merci pour votre disponibilité.

Aux cadres du service Mmes Myriam Marty et Béatrice Sanchez.

A David, merci pour ta disponibilité et ton encadrement pour le stage du DIU, Samira, Nadia, Marion, Estelle, Doriane, Katia, Lionel et François-Xavier.

A l'équipe du CRB, Christelle, Falek, Sophie P, Sophie A, Lisa et Céline.

A l'équipe de recherche de Rangueil, Yvan, Najat, et Serge.

A Laurence et Loubna du SBEC.

Aux différents services qui m'ont accueilli

L'équipe du laboratoire d'Anapath d'Albacete : Teresa Nam, Ana, Jaime, Juan, Pablo, Dr Atienzar Tobarra, he descubierto la anatomía patológica con vosotros, pero también las ferias y las espléndidas lagunas de la Ruidera.

L'équipe du service d'Anapath de Tarbes : Mme Siani, Anne-Marie, Isabelle, Corinne, Marie, Annette, Babeth, Evelyne, j'ai passé un de mes meilleurs semestres à vos côtés !

L'équipe du service de rhumatologie qui m'a vue débiter mon internat, et en particulier à Yannick, Cathy et Sandrine, mes premiers cointernes.

L'équipe du service de génétique où j'ai découvert la CGHarray et bien d'autres choses.

L'équipe de recherche du Pr Brousset, et en particulier Wilfried qui m'a guidée lors mes premiers pas dans le monde de la recherche.

L'équipe de recherche du Dr Cuvillier à l'IPBS : Cécile, merci pour ton accueil au laboratoire lors de mon M2R, ta patience et ta disponibilité pour m'apprendre à « manipuler » et tes nombreux conseils, Adeline, merci pour tes conseils et ton aide précieuse pour la qRT-PCR, le dosage de l'activité kinase..., Guillaume, Isabelle, Anastasia, Magalie, j'ai passé de très bons moments avec vous.

Aux copines du master, Aline ma super binôme et Laure.

A mes amis

A la clique, merci pour votre bonne humeur, votre sens aigu du dos', avec vous c'est fou rire assuré ! Les 3 Ma : Marion, ma plus « vieille » amie, Manue, la baroudeuse toujours prête à suivre Magali, l'ultra traileuse qui se nourrit de pommes et de carottes, Romain et son capital sympathie, et le tout nouveau membre Maxime, aussi zen que ses parents.

Anne-Claire, merci pour ta longue amitié, Benoît, merci pour ton soutien moral et ta motivation pour les week-ends IUC, et vos deux beaux enfants Alice et Théo.

Laura et sa famille, merci d'être toujours là !

Delphine, Laetitia et sa famille, merci pour votre amitié.

Pierre, tu devrais vraiment aller à Hampi ;) et Emilie, c'est super que vous (re)veniez à Toulouse !

Nico, Olivier, Emilie et Damien et leur petit Robin aux yeux de biche, merci pour votre accueil toujours chaleureux et extraordinaire, Arash, merci pour ton accueil à Paris, on t'attend à Toulouse !

Aux amis de la famille : Martine, Caroline et Luc.

Aux copines de la fac

Océane, on a vraiment fait connaissance à Madagascar, quel voyage ! Merci pour ton amitié !

Camille, Marie-Laure, Laure et Anne-Laure, pour les révisions à la BU.

A mes co-internes de premier semestre, Marijke et Sarah : c'est enfin à mon tour ! Marijke, une nouvelle vie s'annonce pour toi, je te souhaite beaucoup de bonheur ! Sarah, j'admire ta force et ta joie de vivre.

A ma famille

Papa et Maman, toujours disponibles, toujours aux petits soins depuis toujours, tout au long des années d'étude, puis d'internat. Merci pour votre aide, votre gentillesse, votre dévouement, les petits plats et les grandes occasions, pour tout !

Geoff, mon grand petit frère, je n'oublierai jamais ton discours, Roxane, ma si forte belle-sœur, Kilian, qui a les plus belles joues à bisous, et la petite princesse de la famille, Elsa, il nous tarde de faire ta connaissance, prend vite des forces !

Mes grands-parents, Mamie Marie-Louise, Mamie Thérèse et Papy Hubert, merci pour tous ces supers souvenirs de vacances, avec les cousins et les cousines, pour toutes vos attentions.

Et bien sûr Papy Dédé, tu nous manques tellement...

Mes oncles et tantes : Nicole et Daniel, Catherine et Jean-Pierre, Michel et Cathy, Régine et Alain, Laurence et Eric.

Mes cousins et cousines : Caroline, toujours partante pour un ciné ou un resto, Pauline et Romain, promis on vient bientôt vous voir à Londres, Thomas et Delphine, vivement qu'on soit presque voisins, Arthur sera ravi de jouer avec Hugo et Tessa, Arnaud et Morgane, Adeline et Julien, je vous souhaite un très beau mariage, Marion, Florian et Tiago, dommage que vous soyez si loin, les deux cousins pourraient faire la course, Pierre et Fanny, Julien et Patricia, Lilou et Chloé, Romain, on ne se voit pas souvent mais c'est toujours un plaisir de vous retrouver.

Ma belle-famille : Nicole et Patrick, merci pour votre gentillesse et les nombreux baby-sittings, Guillaume, Cristina, Mélodie, Romain, Simone, Dédé, Jean-Pierre.

A mes deux hommes

Stéphane, merci pour ces treize ans d'amour et de bonheur, merci d'être là, de me soutenir et de m'aimer encore et toujours, merci de me pousser à réaliser mes rêves !

Arthur, le plus adorable et le plus « gracieux » des petits garçons. Merci pour ton sourire, ton rire et tes petits bras tendus qui réclament un câlin, ils me font fondre à chaque fois !

**IMPLICATION DE LA VOIE SPHINGOSINE KINASE 1 /
SPHINGOSINE 1-PHOSPHATE DANS L'HYPOXIE
INTRATUMORALE DES OSTEOSARCOMES**

SOMMAIRE

ABREVIATIONS UTILISEES	5
FIGURES ET TABLEAUX	7
INTRODUCTION	9
1. GENERALITES	10
1.1. L'ostéosarcome.....	10
1.1.1. Epidémiologie	10
1.1.2. Localisation	10
1.1.3. Caractéristiques cliniques et radiologiques	11
1.1.4. Anatomopathologie des ostéosarcomes	12
1.1.4.1. Classification histologique.....	12
1.1.4.2. Diagnostic histologique	15
1.1.5. Etiologie et facteurs de risque	17
1.1.6. Génétique	18
1.1.7. Principes du traitement des ostéosarcomes	19
1.1.7.1. Chimiothérapie.....	19
1.1.7.2. Chirurgie	20
1.1.7.3. Examen anatomopathologique.....	21
1.1.7.4. Radiothérapie	24
1.1.7.5. Nouvelles thérapies	24
1.1.8. Facteurs pronostiques	26
1.1.8.1. Réponse à la chimiothérapie	26
1.1.8.2. Métastases	27
1.1.8.3. Autres facteurs pronostiques.....	27
1.2. L'hypoxie.....	28
1.2.1. Définition	28
1.2.2. Biologie de l'hypoxie	28
1.2.2.1. Les facteurs HIF.....	28
1.2.2.2. Les gènes cibles de HIF-1	29
1.2.3. Hypoxie et cancer.....	30
1.2.4. Hypoxie et résistance aux traitements.....	31
1.2.5. Hypoxie et ostéosarcome	32

1.3.	La voie sphingosine kinase 1 / sphingosine 1-phosphate / sphingosine 1-phosphate récepteur 1	33
1.3.1.	Les acteurs de la voie SphK1/S1P/S1P1	33
1.3.1.1.	Les sphingosine kinases	34
1.3.1.2.	La sphingosine 1-phosphate.....	35
1.3.1.3.	Les récepteurs de la sphingosine 1-phosphate	35
1.3.2.	Implication de la voie SphK1/S1P en pathologie.....	36
1.3.2.1.	Dans le cancer	36
1.3.2.2.	Dans l'inflammation	36
1.3.3.	Implication de la voie SphK1/S1P dans la régulation de l'hypoxie.....	36
1.3.4.	Implication de la voie SphK1/S1P dans les ostéosarcomes	37
1.3.5.	Ciblage de la voie SphK1/S1P en thérapeutique.....	38
2.	OBJECTIFS DE L'ETUDE	39
3.	MATERIELS ET METHODES	40
3.1.	Sélection des patients.....	40
3.2.	Recueil des données cliniques	40
3.3.	Tissue micro array	41
3.4.	Immunohistochimie	42
3.4.1.	Protocole technique	42
3.4.2.	Interprétation	42
3.5.	Dosage de l'activité enzymatique de la sphingosine kinase 1	43
3.6.	Analyse statistique	44
3.7.	<i>In vitro</i>	44
3.7.1.	Lignées cellulaires.....	44
3.7.2.	Réactifs.....	44
3.7.3.	Western-blot.....	45
3.7.4.	Transfection par les siRNA	46
3.8.	<i>In vivo</i>	46
3.8.1.	Modèle animal.....	46
3.8.2.	Immunohistochimie.....	46
4.	RESULTATS.....	47
4.1.	Chez les patients	47
4.1.1.	Données cliniques	47
4.1.2.	Données phénotypiques.....	50

4.1.3.	Corrélation entre les marqueurs	52
4.1.4.	Réponse à la chimiothérapie	52
4.1.4.1.	Facteurs cliniques.....	52
4.1.4.2.	Marqueurs immunohistochimiques.....	53
4.1.5.	Survie	55
4.1.6.	Métastase	57
4.1.7.	Dosage de l'activité enzymatique de la SphK1	58
4.2.	<i>In vitro</i>	61
4.3.	<i>In vivo</i>	63
5.	DISCUSSION	64
5.1.	Données cliniques.....	64
5.2.	Corrélation entre les marqueurs immunohistochimiques	65
5.3.	Hypoxie et pronostic des ostéosarcomes	66
5.4.	SphK1 et pronostic	67
5.5.	Activité enzymatique de la SphK1	67
5.6.	Perspectives	68
	CONCLUSION.....	69
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	70

ABREVIATIONS UTILISEES

ABC : ATP binding cassette
ATP : adénosine triphosphate
API-AI : Adriamycine/cisPlatine/Ifosfamide- Adriamicine/Ifosfamide
ARNm : acide ribonucléique messenger
ARNT : aryl hydroxycarbon receptor nuclear translocator
BR : bon répondeur
CA-IX : anhydrase carbonique 9
CTL : lymphocyte T cytotoxique
CXCR4 : C-X-C motif chemokine receptor type 4
DMSO : diméthylsulfoxyde
EDG : endothelial differentiation gene
EDTA : Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
EMA : epithelial membrane antigen
ERK1/2 : extracellular signal-regulated kinases 1/2
EURAMOS : European and American Osteosarcoma Study Group
FAK : focal adhesion kinase
FGF : fibroblast growth factor
GFPO : Groupe Français des Pathologistes experts Osseux
GLUT-1 : glucose transporter 1
GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GSF : Groupe Sarcome Français
GETO : Groupe d'Etude des Tumeurs Osseuses
GSK3 β : glucogen synthase kinase 3
HDAC : histone déacétylase
HDL : high density lipoprotein
HIF-1 α : hypoxia-inducible factor 1 α
HRE : hypoxia response element
HRP : horse raddish peroxidase
IC : intervalle de confiance
IFN : interferon
IFO : ifosfamide
IGF1 : insulin-like growth factor-1

IRM : imagerie par résonance magnétique
IRS : immunoreactive score
LDH-5 : lactate dehydrogenase 5
LOX : lysyl oxidase
MDR1 : multi-drug resistance 1
MMP : matrix metalloproteinase
MR : mauvais répondeur
MRP1 : multidrug resistance protein 1
MTX : méthotrexate
NF- κ B : nuclear factor-kappa B
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OR : odds ratio
OS : ostéosarcome
PBS : phosphate buffered saline
PD1 : programmed cell death 1
PDGF : platelet-derived growth factor
PDL1 : programmed cell death ligand 1
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
pVHL : protéine von Hippel-Lindau
RANK : receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
ROS : reactive oxygen species
RTK : récepteur tyrosine kinase
RUNX2 : Runt-related transcription factor 2
S1P : sphingosine 1-phosphate
S1P1 : récepteur 1 de la sphingosine 1-phosphate
siRNA : small interfering ribonucleic acid
SphK1 : sphingosine kinase 1
TGF : transforming growth factor
TMA : tissue microarray
TRAF2 : tumor necrosis factor receptor-associated factor 2
VEGF : vascular endothelial growth factor
VP : VP16 (étoposide)

FIGURES ET TABLEAUX

Liste des figures

Figure 1. Pourcentages de répartition des ostéosarcomes sur le squelette.	11
Figure 2. Imagerie d'un ostéosarcome de l'extrémité inférieure du fémur.	12
Figure 3. Sous-types histologiques des ostéosarcomes conventionnels.	14
Figure 4. Examen microscopique d'un ostéosarcome de haut grade conventionnel.	16
Figure 5. Protocole thérapeutique de l'étude OS 2006.	20
Figure 6. Prise en charge macroscopique de la pièce de résection osseuse.	22
Figure 7. Evaluation de la réponse à la chimiothérapie selon la classification de Huvos et Rosen.	23
Figure 8. Métabolisme de HIF-1 α en condition normale d'oxygène et en hypoxie.	29
Figure 9. Le biostat sphingolipidique.	33
Figure 10. Structure des sphingosine kinases 1 et 2 (d'après Spiegel et al., 2003).	34
Figure 11. Régulation de HIF-1 α par la voie SphK1/S1P dans les cellules tumorales en hypoxie (Ader et al., 2009).	37
Figure 12. Exemples de marquages immunohistochimiques.	51
Figure 13. Survie globale dans la série OS hors 2006 en fonction de l'expression de GLUT-1, de la SphK1, ou de S1P1.	55
Figure 14. Survie globale dans la série OS 2006 en fonction de l'expression de GLUT-1, de la SphK1, ou de S1P1.	56
Figure 15. Survie globale dans la série OS de la mandibule en fonction de l'expression de GLUT-1, de la SphK1, ou de S1P1.	56
Figure 16. Activité enzymatique de la SphK1 dans l'os normal et dans les ostéosarcomes.	59
Figure 17. Dosage de l'activité enzymatique de la SphK1 dans 10 échantillons d'os normaux et 13 échantillons d'ostéosarcomes.	60
Figure 18. Cinétique de l'expression de HIF-1 α en hypoxie dans la lignée U-2 OS.	61
Figure 19. Effet des inhibiteurs pharmacologiques de la SphK1 sur le taux de HIF-1 α en hypoxie.	62
Figure 20. Effet de l'inhibition de la SphK1 par des siRNA sur le taux de HIF-1 α	62
Figure 21. Corrélation entre l'hypoxie et l'expression de la SphK1 dans un modèle animal d'ostéosarcome.	63

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des ostéosarcomes selon l'OMS 2013.	13
Tableau 2. Evaluation de la réponse à la chimiothérapie selon la classification de Huvos et Rosen (1982).	23
Tableau 3. Principaux gènes cibles du facteur HIF-1 (d'après Harris et al. 2002)	30
Tableau 4. Anticorps utilisés en immunohistochimie et conditions d'utilisation.	42
Tableau 5. Score d'immunomarquage IRS, en fonction de l'intensité du marquage et du pourcentage de cellules marquées.	43
Tableau 6. Anticorps utilisés en Western-blot et conditions d'utilisation.	45
Tableau 7. Résumé des caractéristiques cliniques des patients.....	49
Tableau 8. Expression des marqueurs GLUT-1, SphK1 et S1P1 selon le score d'immunomarquage IRS.	50
Tableau 9. Influence des paramètres cliniques sur la réponse à la chimiothérapie.....	53
Tableau 10. Corrélation entre l'expression des marqueurs évaluée selon l'IRS et la réponse à la chimiothérapie, pour chacune des trois séries.	54
Tableau 11. Etude de l'expression des marqueurs évaluée selon l'IRS en fonction de la présence ou de l'absence de métastase, pour chacune des trois séries.....	57
Tableau 12. Récapitulatif du dosage de l'activité enzymatique de la SphK1 et des caractéristiques des patients.	58

INTRODUCTION

L'ostéosarcome est la tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente. Elle touche particulièrement les adolescents et les adultes jeunes. L'association de la chimiothérapie néoadjuvante et de l'exérèse chirurgicale a permis d'améliorer considérablement le pronostic dans les années 1980, et est aujourd'hui le traitement de référence. Malgré les progrès apportés par la polychimiothérapie, la survie à cinq ans reste d'environ 70 % et il n'y a pas eu d'amélioration significative au cours des deux dernières décennies. A ce jour, les deux principaux facteurs pronostiques sont la réponse au traitement et la présence ou non de métastases, ces dernières faisant chuter la survie à cinq ans à 30%. Le développement de nouvelles thérapies, et la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques, apparaît donc nécessaire.

Dans de nombreuses tumeurs malignes solides, y compris les ostéosarcomes, l'hypoxie et la surexpression de son facteur clé HIF-1 α sont associées à un phénotype agressif, à la résistance au traitement et à un plus mauvais pronostic. La voie sphingosine kinase 1 / sphingosine 1-phosphate a récemment été impliquée dans la régulation de l'hypoxie dans plusieurs modèles de cancers. La sphingosine kinase 1 est également associée à un plus mauvais pronostic dans plusieurs cancers. Dans les ostéosarcomes, il semble que cette voie soit associée à la résistance à la chimiothérapie *in vitro*. Cependant l'implication de cette voie chez les patients atteints d'ostéosarcome n'est pas décrite.

Notre objectif était d'étudier le rôle de la voie sphingosine kinase 1 / sphingosine 1-phosphate dans l'hypoxie intra-tumorale des ostéosarcomes, et de déterminer son impact sur le pronostic des patients.

1. GENERALITES

1.1. L'ostéosarcome

1.1.1. Epidémiologie

L'ostéosarcome (OS) est la tumeur maligne primitive osseuse la plus fréquente, en particulier chez les adolescents et les adultes jeunes. L'incidence est de 0,2 à 0,3 nouveaux cas pour 100 000 habitants par an en Europe¹ et de 1 à 3 cas par million d'habitants et par an à l'échelle mondiale.² En France, environ 150 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année.³ Il existe deux pics de fréquence. Le pic principal survient chez les adolescents et les adultes jeunes. L'OS est rare avant 5 ans, et son incidence augmente progressivement jusqu'à la puberté. Elle est maximale entre 15 et 19 ans avec 0,8 à 1,1 cas par an pour 100 000 habitants, représentant dans cette tranche d'âge plus de 10% des cancers solides. Le deuxième pic de fréquence, minoritaire, concerne les patients après 60 ans. Il s'agit alors, dans la moitié des cas, d'OS secondaires développés sur une pathologie osseuse préexistante ou en territoire irradié.

Quel que soit l'âge, il existe une légère prédominance masculine avec un sex ratio de 1,35 hommes pour 1 femme.⁴

1.1.2. Localisation

Les OS se développent préférentiellement au niveau des métaphyses des os longs, près des épiphyses dites « fertiles ».⁴ Plus de la moitié des OS sont localisés près du genou, à l'extrémité inférieure du fémur dans 30% des cas, ou à l'extrémité supérieure du tibia dans 15% des cas. Au membre supérieur, les OS se développent le plus souvent au niveau de l'extrémité supérieure de l'humérus, dans environ 15% des cas. La répartition des OS sur le squelette est résumée dans la figure 1.

Les OS de la mandibule ou du maxillaire sont rares. Ils touchent essentiellement les patients de plus de 60 ans, représentant 5,8% des OS après 60 ans, contre 1,9% avant l'âge de 25 ans.⁴ La particularité des OS de la mandibule et du maxillaire est un risque de récurrence locale supérieur aux OS des autres localisations, survenant chez près de la moitié des patients. Ils se

distinguent également par un risque moindre de métastase. La plupart des décès résultent des complications de la récurrence locale.⁵

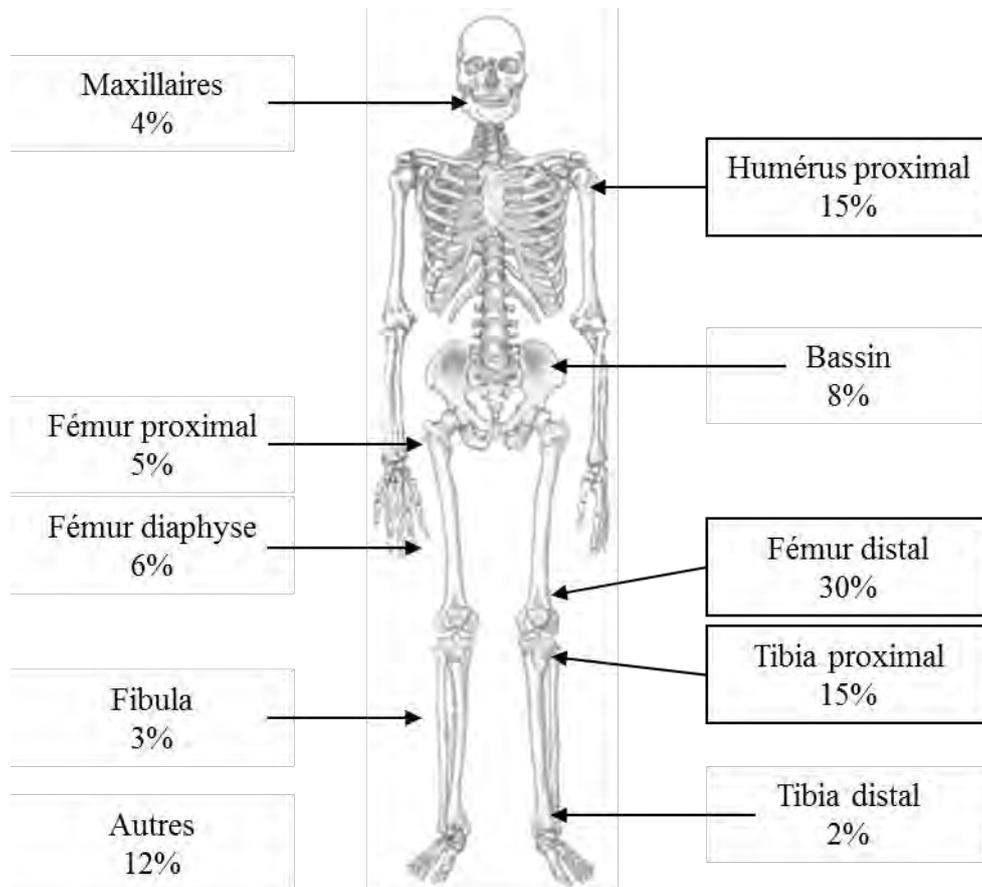


Figure 1. Pourcentages de répartition des ostéosarcomes sur le squelette.

1.1.3. Caractéristiques cliniques et radiologiques

Sur le plan clinique, le symptôme principal des OS, bien que non spécifique, est la douleur. Il s'agit d'une douleur profonde pouvant évoluer sur plusieurs semaines ou mois. L'examen clinique peut mettre en évidence une masse palpable, avec un œdème, un érythème et une chaleur de la peau en regard. Certaines tumeurs de grande taille peuvent entraîner une diminution des amplitudes articulaires et de la force musculaire ou un épanchement articulaire. Une fracture pathologique survient chez 5 à 10% des patients.

Sur le plan radiologique, les OS peuvent être polymorphes.⁶ Le plus souvent, il s'agit d'une lésion mixte, à la fois ostéolytique et ostéocondensante, mal limitée, associée à une destruction de la corticale et une extension dans les tissus mous adjacents (figure 2A). Plus

rarement, il s'agit d'une lésion purement ostéolytique ou ostéocondensante. La tumeur s'accompagne de signes de réaction périostée (triangle de Codman, réaction périostée spiculée en « feu d'herbe » ou plurilamellaire en « bulbe d'oignon »).

L'IRM est indispensable pour préciser l'extension de la tumeur et évaluer les possibilités d'exérèse en préopératoire, particulièrement en cas de chirurgie conservatrice (figures 2B et 2C).

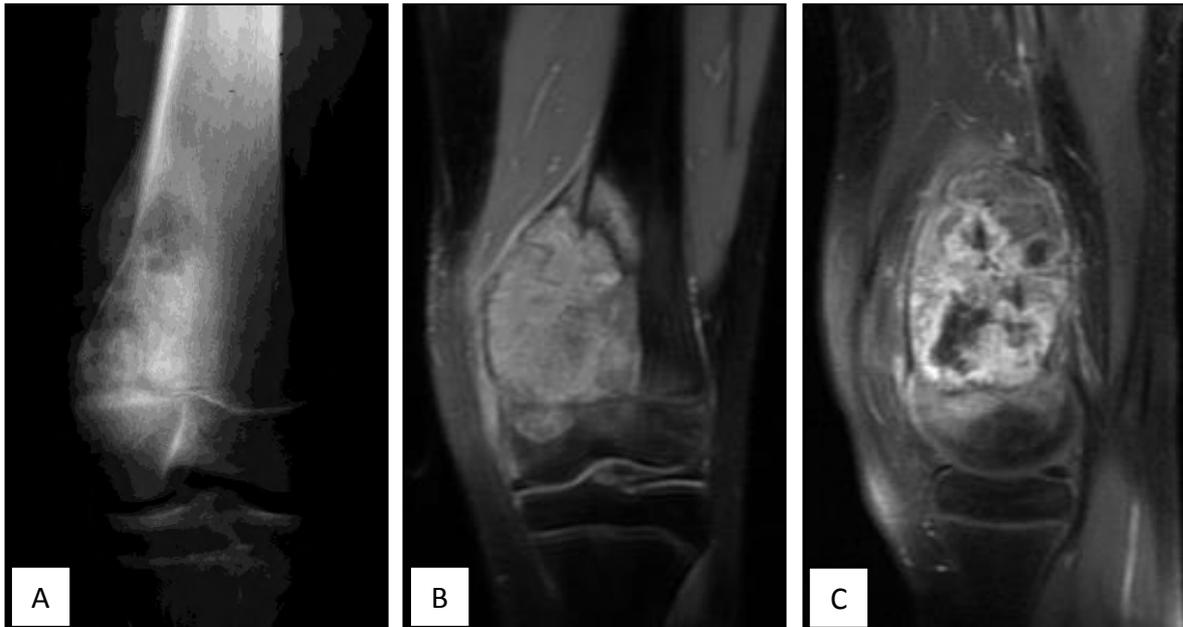


Figure 2. Imagerie d'un ostéosarcome de l'extrémité inférieure du fémur.

A. Radiographie de face : tumeur métaphysaire ostéolytique et condensante avec réaction périostée. B. Imagerie par résonance magnétique (plan coronal, séquence T2 FAT SAT) : tumeur détruisant la corticale et infiltrant les tissus mous. C. Imagerie par résonance magnétique (plan sagittal, séquence T1 FAT SAT après injection de gadolinium) : la tumeur est rehaussée en périphérie.

1.1.4. Anatomopathologie des ostéosarcomes

1.1.4.1. Classification histologique

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) classe les OS en fonction de leur localisation sur l'os par rapport au cortex, et en fonction du grade de malignité.⁶ Elle distingue ainsi les OS centraux (ou intra-médullaires) et les OS de surface (tableau 1).

Tableau 1. Classification des ostéosarcomes selon l'OMS 2013.

	Sous-type	Grade	Fréquence
OS centraux	OS central de bas grade	Bas grade	1-2%
	OS conventionnel - ostéoblastique - chondroblastique - fibroblastique	Haut grade	85%
	OS télangiectasique	Haut grade	4%
	OS à petites cellules	Haut grade	1,5%
	OS secondaire - sur Maladie de Paget - en territoire irradié	Haut grade	1% 2,7-5,5%
	OS de surface	OS paraostéal	Bas grade
OS périosté		Grade intermédiaire	< 2%
OS de surface de haut grade		Haut grade	< 1%

Les OS centraux peuvent être de bas grade, ou de haut grade et sont alors de type conventionnel, télangiectasique ou à petites cellules.

Les OS conventionnels se développent dans plus de 90% des cas au niveau de la métaphyse des os long. Ce sont les plus fréquents et représentent environ 85% de tous les OS.

Il en existe trois principaux sous-types en fonction de la matrice prédominante synthétisée par les cellules néoplasiques (figure 3) :

- OS ostéoblastiques, les plus fréquents (77-80% des cas)
- OS chondroblastiques (10-13%)
- OS fibroblastiques (10%)

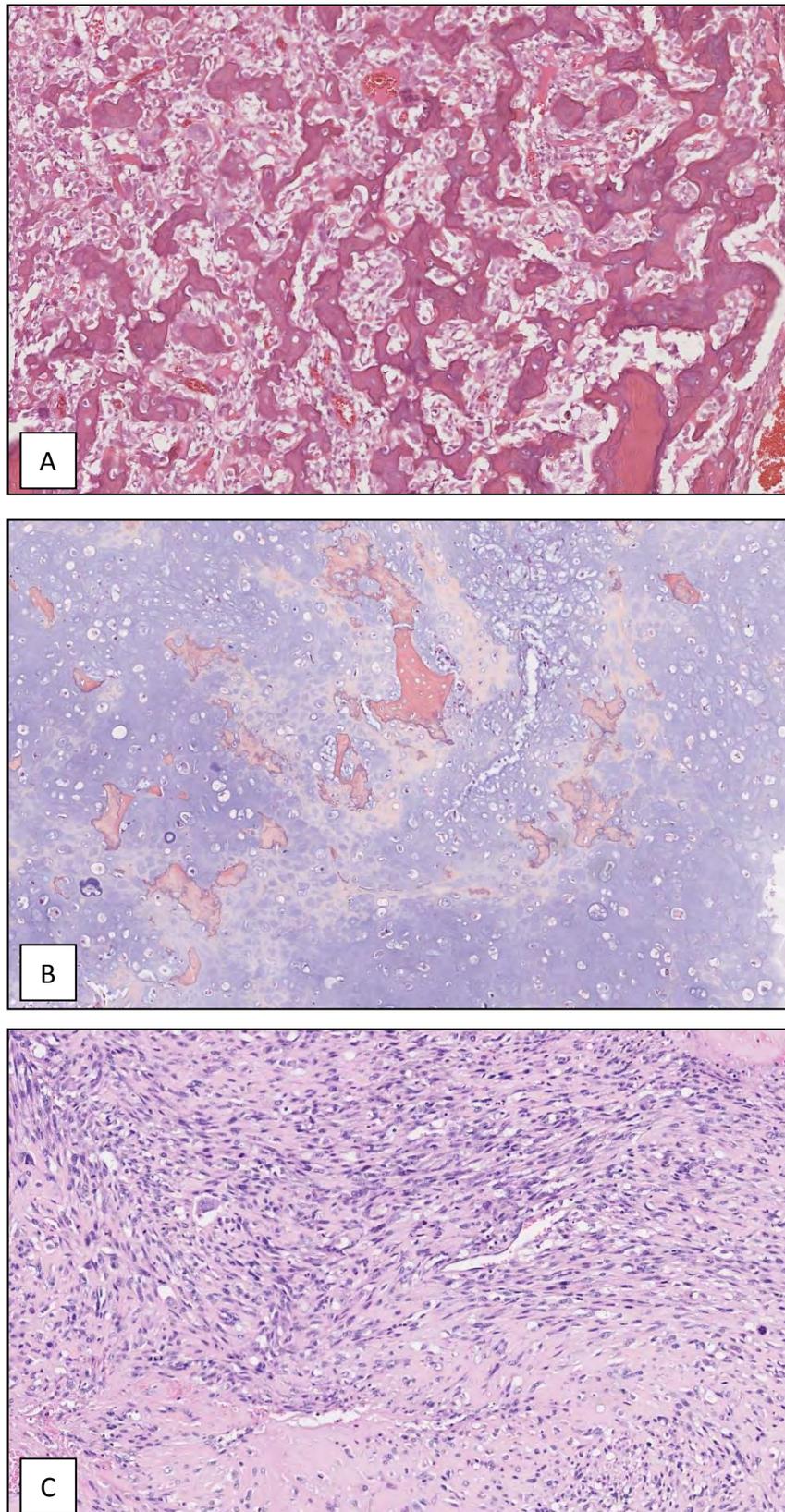


Figure 3. Sous-types histologiques des ostéosarcomes conventionnels.

A. OS ostéoblastique (x10). B. OS chondroblastique (x10). C. OS fibroblastique (x10).

Ces différents sous-types d'OS conventionnels sont distingués uniquement par des caractéristiques histologiques. Ils ne modifient ni le traitement, ni le pronostic.

L'OMS distingue également des variants des OS conventionnels : OS riche en cellules géantes, OS ressemblant à l'ostéoblastome (osteoblastoma-like), OS épithélioïde, OS à cellules claires et OS ressemblant au chondroblastome (chondroblastoma-like). Ils ont le même pronostic que les OS conventionnels.

Les OS de surface sont classés en OS paraostéal de bas grade, en OS périosté de grade intermédiaire ou OS de surface de haut grade. Ils représentent moins de 7% des OS.

1.1.4.2. Diagnostic histologique

Les OS conventionnels peuvent être de morphologie variable. Ils occupent la cavité médullaire, détruisent les travées osseuses et s'étendent jusqu'à la corticale en infiltrant les travées de Havers. Les cellules tumorales sont atypiques, avec un pléomorphisme marqué (figure 4A). Elles ont un cytoplasme éosinophile, parfois clarifié. Les noyaux sont pléomorphes, le plus souvent hyperchromatiques, augmentés de taille et de contours irréguliers. Il peut s'y associer des cellules géantes. Les figures de mitose sont nombreuses.

L'élément essentiel du diagnostic d'un OS est la présence de substance ostéoïde synthétisée par les cellules tumorales. L'ostéoïde correspond à une matrice osseuse non minéralisée. Elle apparaît histologiquement sous la forme d'un matériel intercellulaire éosinophile, amorphe et dense. Elle est étroitement associée aux cellules tumorales et forme typiquement un réseau grêle dit « en dentelle » (figure 4B).

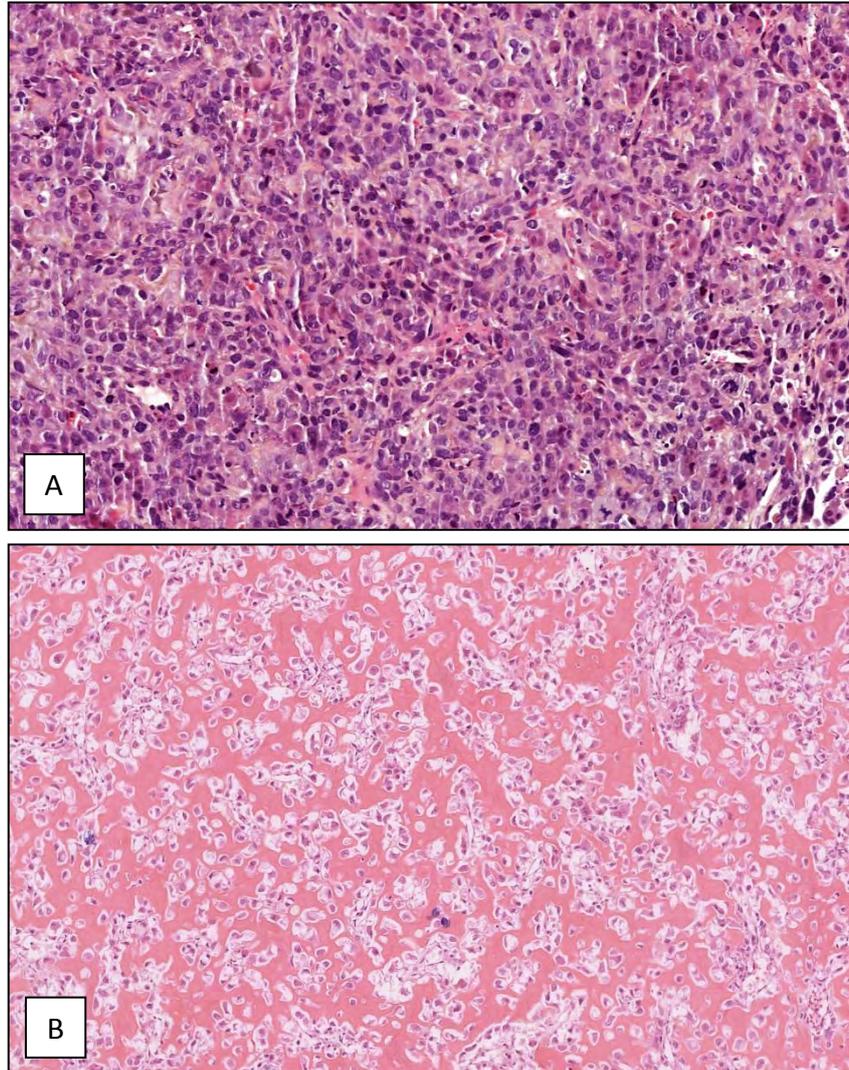


Figure 4. Examen microscopique d'un ostéosarcome de haut grade conventionnel.

A : cellules tumorales atypiques, avec quelques cellules géantes et de nombreuses mitoses (x20). B : substance ostéoïde tumorale formant un réseau grêle en dentelle autour des cellules ostéosarcomateuses (x10).

L'immunophénotype des OS est peu spécifique. Ils expriment classiquement la protéine S100, l'actine musculaire lisse, le CD99, la NSE, l'ostéocalcine et l'ostéonectine. Dans certains cas, on peut observer une expression des cytokératines et de l'EMA.⁶ Récemment il a été montré que SAT B2 (Special AT-rich sequence-binding protein 2) était un marqueur très sensible (94 %) de la différenciation ostéoblastique et des OS, et que certains sarcomes de haut grade indifférenciés pourraient correspondre à des OS dont la matrice ostéoïde tumorale ne serait pas visible en microscopie optique.⁷

1.1.5. Etiologie et facteurs de risque

L'étiologie des OS est peu connue. Cependant, des études épidémiologiques ont permis d'évoquer des facteurs de risque potentiels de survenue d'un OS. De plus, il existe une incidence plus élevée des OS dans certains syndromes de prédisposition au cancer.

Croissance et taille

Le pic d'incidence lors de la puberté est favorisé par le renouvellement rapide de l'os lors de cette période de croissance. De même, la localisation préférentielle au niveau des épiphyses dites « fertiles » chez les patients jeunes renforce l'hypothèse d'un lien entre croissance et OS. Plusieurs études ont rapporté qu'une taille supérieure à la moyenne était un facteur de risque de survenue d'un OS. Un poids de naissance élevé (supérieur à 4,045 kg) semblerait être également un facteur de risque.⁸

Pathologies osseuses

Chez l'adulte, l'OS est secondaire dans plus de la moitié des cas. Le principal facteur de risque est la maladie de Paget, retrouvée dans environ 50% des OS survenant après 60 ans.⁹ La maladie de Paget est en effet responsable d'une augmentation du remodelage osseux. La transformation en OS survient dans 1% des cas. Elle est favorisée par une maladie polyostotique ou par la présence d'une mutation du gène *SQSTM1* (sequestosome 1) dans les cas familiaux. Les OS secondaires se développent également en territoire irradié¹⁰ ou sur une pathologie osseuse préexistante telle que l'infarctus osseux, la dysplasie fibreuse, un kyste osseux simple ou une tumeur fibromyxoïde liposclérosante.⁶

Syndromes de prédisposition au cancer

Le syndrome de Li Fraumeni, caractérisé sur le plan génétique par une mutation germinale du gène *TP53* sur le chromosome 17p13, est associé à un risque accru de survenue de cancers, et en particulier les sarcomes dont les OS. Ce risque augmente avec l'âge (OR : 1,41 avant 20 ans, OR : 4,61 après 20 ans).¹¹

Les patients atteints d'un rétinoblastome héréditaire, porteurs d'une mutation du gène *RBI* sur le chromosome 13q14, ont un risque de 25 à 30% de développer un OS secondaire. Dans 60% des cas, ces OS ont été favorisés par la radiothérapie et surviennent dans le champ d'irradiation.¹²

L'incidence des OS est également augmentée dans plusieurs syndromes rares de transmission autosomique récessive, liés à des mutations des gènes des hélicases de la famille RecQ. Le syndrome de Rothmund–Thomson est dû à une mutation du gène *RECQL4* en 8q24. 30% des patients atteints développent un OS. Le syndrome de Werner, dû à une mutation du gène *WRN* codant la RECQL2 et responsable d'un vieillissement prématuré, est associé à un OS dans 10% des cas. Le syndrome de Bloom, causé par une mutation de *BLM* et responsable d'un retard de croissance pré et post-natal, est également associé à un risque accru d'OS. Le syndrome RAPADILINO est associé à un OS dans 13% des cas. Il est dû, comme le syndrome de Rothmund-Thomson, à une mutation du gène *RECQL4*.^{2,4,13}

1.1.6. Génétique

Les OS de haut grade de type conventionnel sont des tumeurs instables à génomique complexe.

Il existe en effet dans les OS de nombreuses mutations somatiques et anomalies du nombre de copies. Des mutations ponctuelles ont été rapportées, survenant en particulier sur les gènes *TP53* (dans 80 à 90% des cas) et *RBI* (dans 10 à 39% des cas) dans des cas d'OS sporadiques.¹⁴ D'autres mutations récurrentes sur les gènes *ATRX*, *DLG2*, *RUNX2* et *PTEN* ont également été rapportées dans 30 à 55% des cas.¹⁴ Une étude récente a analysé par séquençage haut débit l'exome de 6 cas d'OS et a mis en évidence de nombreuses mutations. Certaines mutations étaient récurrentes et déjà connues, en particulier les mutations de *TP53* et *RBI*, soulignant le rôle de ces gènes dans l'oncogenèse des OS. D'autres mutations, plus nombreuses, n'avaient jamais été décrites et soulignent la grande hétérogénéité des anomalies génétiques dans les OS.¹⁵

Des anomalies du nombre de copies ont été rapportées, telles que des délétions ou pertes d'hétérozygotie, par exemple de la région 3q13,¹⁶ ou des amplifications ou gains des régions 6p12-21 et 8q.¹⁷

Cette forte instabilité génétique et l'extrême hétérogénéité du génome des OS pourraient s'expliquer par un mécanisme de chromothripsis (du grec *chromos* pour « chromosome » et *thripsis* signifiant « éclatement en morceaux »), rapporté dans 2 à 3% des cancers. Ce phénomène correspond à un événement cataclysmique et se caractérise par une fragmentation

importante et soudaine d'une partie ou de la totalité des chromosomes, suivie d'un réassemblage aberrant. La survenue de ce mécanisme est estimée à 33% dans les OS.¹⁸

1.1.7. Principes du traitement des ostéosarcomes

La prise en charge thérapeutique des OS est multidisciplinaire et associe oncologues, radiologues, chirurgiens, anatomopathologistes, radiothérapeutes, psychologues,... Elle est discutée avant la biopsie diagnostique et après la chimiothérapie néoadjuvante si celle-ci a été réalisée. Le bilan préopératoire d'extension locale et à distance repose essentiellement sur l'IRM. Il doit être réalisé au moins 3 mois avant la chirurgie, avec une nouvelle évaluation 6 semaines avant.

Avant le début des années 1980, le traitement des OS consistait le plus souvent en une amputation. Malgré ce traitement radical, le pronostic était mauvais et 80 à 90% des patients développaient secondairement des métastases, avec une médiane de 5 mois.¹⁹

Depuis, l'amélioration des techniques chirurgicales et les progrès de la chimiothérapie ont permis d'améliorer considérablement le pronostic des patients dans les années 1980 et 1990. Le traitement de référence associe actuellement une polychimiothérapie et une chirurgie le plus souvent conservatrice.

Au cours de la dernière décennie, il n'y a pas eu d'amélioration significative de la survie. Le développement de nouvelles thérapies ciblées est donc nécessaire, en particulier dans les cas d'OS résistants aux traitements.²⁰

1.1.7.1. Chimiothérapie

Depuis la fin des années 1970, l'utilisation de la chimiothérapie en néoadjuvant puis l'association de plusieurs chimiothérapies a permis d'améliorer significativement la survie globale des patients. Le taux de survie globale à 5 ans est ainsi passé de 17% à 71%.^{19,21} La survie à 5 ans reste inférieure à 25 % chez les patients qui présentent des métastases au moment du diagnostic et chez ceux qui sont mauvais répondeurs à la chimiothérapie.

Deux protocoles de chimiothérapie néoadjuvante sont actuellement utilisés. Le choix dépend de l'âge du patient. Avant 18 ans, le protocole thérapeutique est basé sur l'étude OS94, et associe le méthotrexate (MTX) à haute dose avec l'étoposide (VP) et l'ifosfamide (IFO).

Après 25 ans, les patients sont traités selon le protocole API-AI, basé sur l'alternance doxorubicine/cisplatine/ifosfamide et doxorubicine/ifosfamide. Entre 18 et 25 ans, le choix du protocole thérapeutique dépend du centre.

L'étude française multicentrique OS 2006, de laquelle sont issus une partie des patients de notre étude, a comparé l'effet d'un biphosphonate, le zolédronate (Zometa®) en association avec le traitement habituel (MTX ou API-AI) dans un essai clinique randomisé de phase III (figure 5).

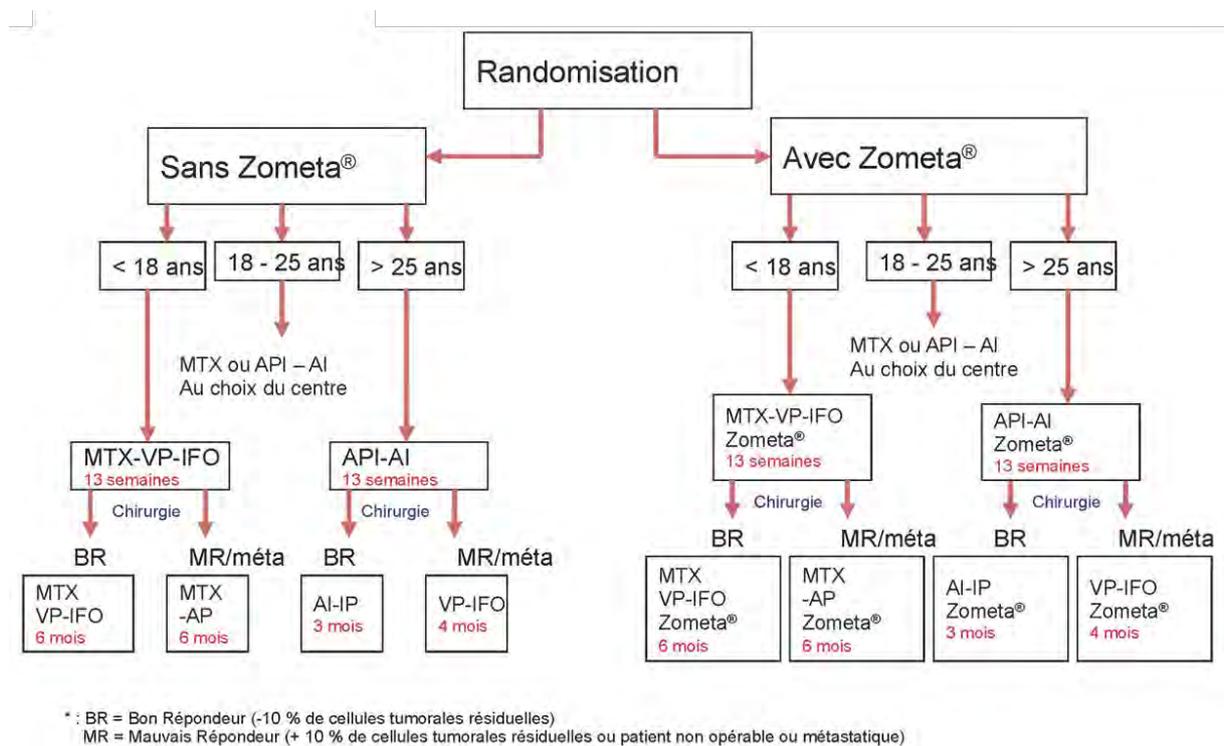


Figure 5. Protocole thérapeutique de l'étude OS 2006.

1.1.7.2. Chirurgie

La prise en charge chirurgicale des OS fait suite à la chimiothérapie néoadjuvante. Elle est le plus souvent conservatrice lorsque cela est possible. Elle est réalisée par un chirurgien expert, selon les règles de chirurgie des sarcomes. Elle consiste en une exérèse large, avec une marge minimale de 2 mm (recommandations françaises du GSF-GETO, Groupe Sarcome Français - Groupe d'Etude des Tumeurs Osseuses) ou emportant une barrière naturelle (aponévrose), sans jamais voir la tumeur. La résection doit également emporter le trajet de la biopsie afin de réduire le risque de récurrence locale.

La reconstruction après la résection conservatrice dépend de la localisation, de l'âge du patient et du pronostic. La reconstruction articulaire par prothèse est la plus utilisée. Différents types de prothèses sont disponibles : modulaire, de croissance.... D'autres techniques de reconstruction sont possibles : arthrode, péroné vascularisé.... La reconstruction diaphysaire fait appel à des allogreffes ou autogreffes. Dans certains cas, une résection conservatrice n'est pas possible et l'amputation est nécessaire : lorsqu'il existe un envahissement neurovasculaire, une extension locorégionale trop importante ou en cas de récurrence locale ou d'infection.

1.1.7.3. Examen anatomopathologique

La pièce de résection chirurgicale est adressée au laboratoire d'anatomie pathologique. Les objectifs de l'analyse anatomopathologique sont de déterminer l'extension tumorale, d'évaluer les marges de l'exérèse chirurgicale et d'apprécier l'efficacité de la chimiothérapie néoadjuvante afin d'adapter la chimiothérapie adjuvante.

Protocole de prise en charge macroscopique

La pièce de résection chirurgicale est orientée et mesurée. Dans le cas des os longs, des tranches de section macroscopiques sont réalisées selon un protocole détaillé dans la figure 6A.

Une tranche de section totale médiane est réalisée dans le plan frontal. Les autres tranches de section sont réalisées perpendiculairement à la première tranche de section, suivant un plan longitudinal. Chaque tranche de section est photographiée et orientée. La tumeur est mesurée dans ses plus grandes dimensions.

La tranche de section totale frontale et les demi-tranches de section perpendiculaires représentatives sont ensuite découpées selon un quadrillage et incluses en totalité au sein de grands blocs ou de petits blocs selon les cas. Les différents prélèvements sont repérés et orientés sur la photographie des tranches de section ou sur un schéma (figure 6B).

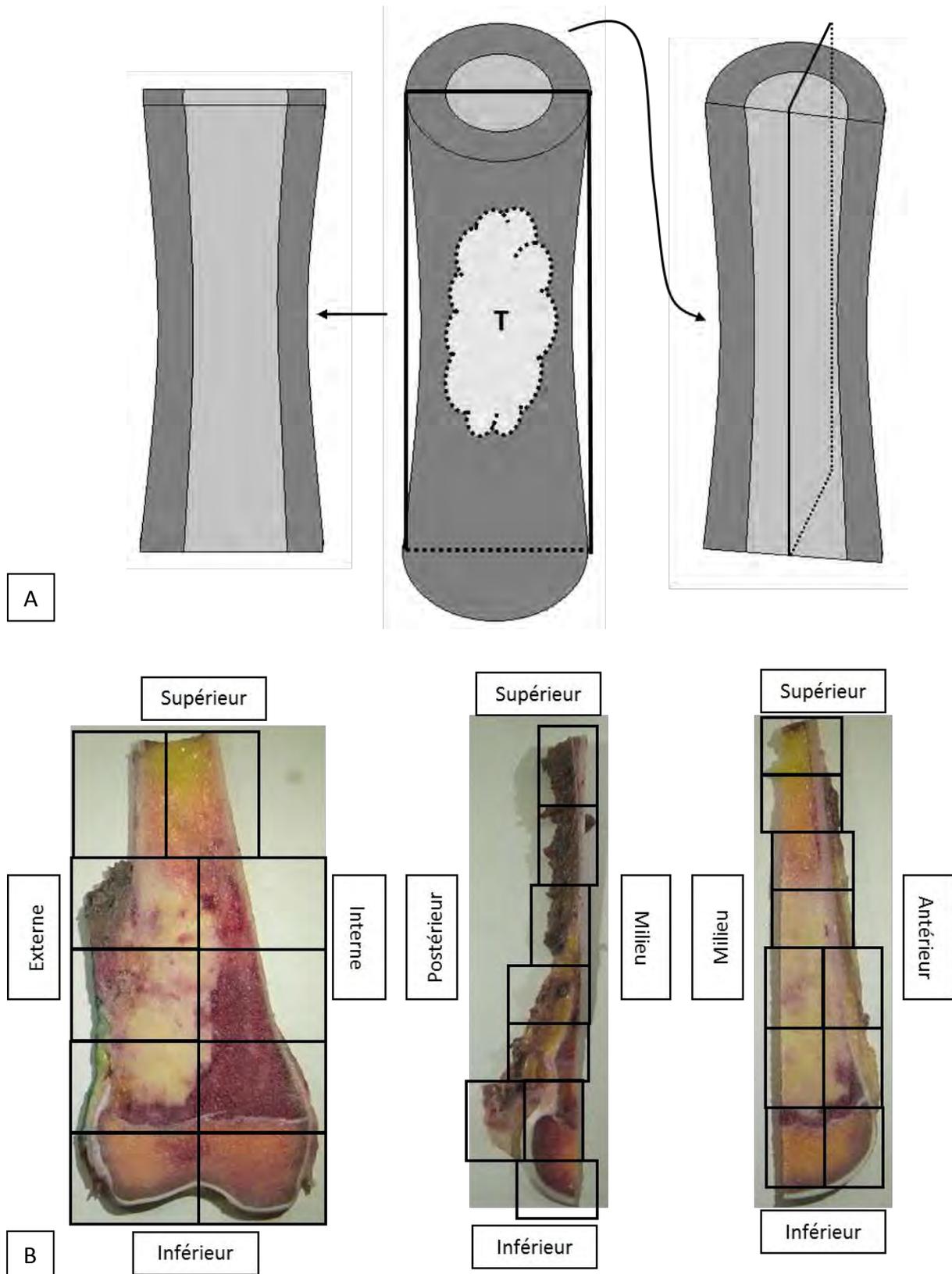


Figure 6. Prise en charge macroscopique de la pièce de résection osseuse.

A. Réalisation d'une tranche de section totale médiane et de demi-tranches de section perpendiculaires. B. Inclusion en totalité des tranches de section.

Evaluation de la réponse à la chimiothérapie

L'analyse de la pièce opératoire permet de classer les patients en bons ou mauvais répondeurs selon la classification de Huvos et Rosen (tableau 2). Celle-ci évalue le pourcentage de nécrose tumorale attribuée à la chimiothérapie néoadjuvante.²²

Tableau 2. Evaluation de la réponse à la chimiothérapie selon la classification de Huvos et Rosen (1982).

Classification de Huvos et Rosen			
Mauvais répondeur	Grade I	Peu ou pas d'effet de la chimiothérapie	Peu ou pas de nécrose tumorale
	Grade II	Réponse partielle	Foyers tumoraux histologiquement viables > 10% masse tumorale
Bon répondeur	Grade III	Réponse quasi-complète	Foyers tumoraux viables épars < 10% masse tumorale
	Grade IV	Réponse complète	Pas de cellule viable (100% de nécrose tumorale)

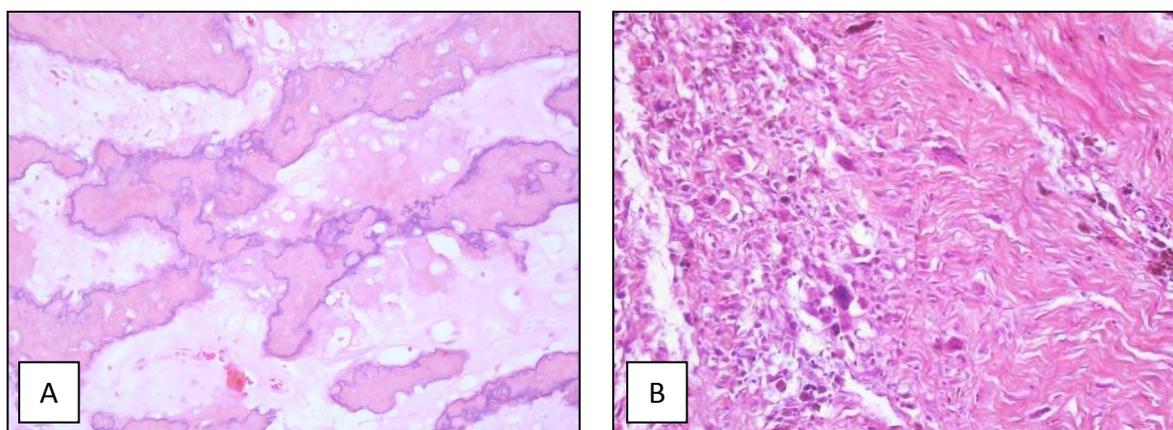


Figure 7. Evaluation de la réponse à la chimiothérapie selon la classification de Huvos et Rosen.

A. Bonne réponse : absence de cellule tumorale viable résiduelle. Les cellules tumorales sont remplacées par de la fibrose ou de l'œdème. B. Mauvaise réponse : persistance de cellules tumorales viables.

1.1.7.4. Radiothérapie

L'OS est une tumeur relativement radorésistante. La radiothérapie ne fait donc pas partie du traitement de référence en première intention. Elle est cependant utilisée en cas de tumeurs non résecables, comme c'est souvent le cas pour les OS axiaux, ou métastatiques. Elle est alors associée à la chimiothérapie. La radiothérapie est aussi utilisée à visée antalgique en cas de métastase osseuse douloureuse.²³

1.1.7.5. Nouvelles thérapies

La carcinogenèse des OS n'est pas liée à la mutation d'un gène spécifique ou à une voie de signalisation en particulier, mais à des mécanismes génétiques complexes. Les mutations récurrentes cibles étant peu fréquentes, les différents essais cliniques effectués avec des molécules potentielles connues se sont avérés décevants.² D'autres cibles potentielles sont en cours d'étude et d'évaluation.

Thérapies ciblant le système immunitaire

Plusieurs stratégies thérapeutiques modulant le système immunitaire ont montré des résultats prometteurs dans le traitement des OS.^{2,24}

L'utilisation du mifamurtide dans sa forme liposomale (L-MTP-PE, muramyl tripeptide phosphatidyl éthanolamine), connu pour déclencher une réponse inflammatoire qui active les monocytes et les macrophages, a montré dans un essai de phase III une amélioration de la survie globale chez les patients non métastatiques (survie à 6 ans de 78% contre 70%).²⁵ L'analyse de la survie sans événement n'était toutefois pas significative. Du fait de ces résultats contradictoires, le L-MTP-PE n'est actuellement approuvé que pour une utilisation dans l'Union Européenne.

Les interférons (IFN) sont un groupe de protéines de la famille des cytokines. Ils stimulent le système immunitaire et ont une activité anti-angiogénique et anti-tumorale. L'IFN- α -2b a montré une inhibition de la croissance des lignées ostéosarcomateuses et de xénogreffes dans un modèle de souris. Chez les patients, l'essai de phase III EURAMOS en traitement d'entretien n'a toutefois pas montré d'amélioration de la survie sans événement.

Le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) est un facteur de croissance ayant montré son efficacité dans le traitement des mélanomes et des sarcomes d'Ewing. Dans un essai de phase II chez des patients atteints d'un OS métastatique au poumon, le GM-CSF n'a pas montré d'effet sur la métastase ou la survie.

L'inhibition des points de contrôle immunitaires, tels que PD1 et son ligand PDL1, est à l'étude et semble prometteuse dans le traitement des OS. En effet, les sarcomes qui présentent une grande hétérogénéité mutationnelle engendrent généralement la production de nombreux néoantigènes responsables du contrôle de la réponse immunitaire au profit du développement tumoral. La liaison de PD1 (exprimé à la surface des lymphocytes T cytotoxiques ou CTL) et de PDL1 (à la surface des cellules tumorales) bloque la prolifération des CTL, inhibe la production de cytokines et favorise ainsi la progression tumorale. Des expérimentations précliniques dans un modèle d'OS métastatique ont montré que le blocage par un anticorps anti-PDL1 augmentait significativement la survie des souris comparativement aux animaux non traités, et que le blocage de PDL1 combiné avec un traitement anti-CTLA-4 entraînait un contrôle complet de la progression tumorale dans 50% des souris traitées.

Les inhibiteurs de Récepteurs Tyrosine Kinase (RTK)

Les récepteurs tyrosine kinase (RTK) sont des récepteurs membranaires jouant un rôle important dans l'activation de voies de signalisation intracellulaires. De nombreux RTK ou leurs ligands sont surexprimés dans les OS, parmi lesquels VEGF, IGF1, PDGF, HER2 et MET. Plusieurs inhibiteurs des RTK ont montré un effet anti-tumoral *in vitro* ou sur des xénogreffes d'OS chez la souris. Des essais cliniques de phase I ou II sont en cours.²⁴

Les inhibiteurs de la signalisation intracellulaire

Src (steroid receptor co-activator) est une protéine TK non récepteur, essentielle pour l'activité ostéoclastique normale. Elle est activée dans les OS. Des inhibiteurs de Src tels que le dasatinib ou saracatinib sont en cours d'essais de phase II.²

mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) est une sérine/thréonine protéine kinase, impliquée dans la voie PI3K/Akt, régulant la synthèse des protéines, le cycle cellulaire et la survie. Elle est activée dans les OS et sa surexpression a été corrélée à un plus mauvais pronostic. Les kinases de la famille Aurora sont des régulateurs clés de la mitose et du cycle

cellulaire. L'inhibition de mTOR ou de la kinase Aurora A a montré un effet anti-tumoral dans les études précliniques. Cependant, les premiers essais cliniques n'ont pas montré l'efficacité des traitements inhibiteurs chez les patients.²⁴

Le microenvironnement osseux

L'implication du microenvironnement semble participer activement à la progression des tumeurs osseuses, notamment par l'établissement d'un « cercle vicieux » entre les cellules d'OS et les ostéoclastes. En effet, les cellules d'OS sont capables de sécréter des facteurs activateurs de la résorption osseuse (inducteurs de la différenciation et de l'activation des précurseurs ostéoclastiques). Une fois activés, les ostéoclastes vont dégrader la matrice osseuse permettant la libération de cytokines et de facteurs de croissance stockés dans l'os (TGF- β , IGF-1, PDGF...) qui vont à leur tour activer la prolifération des cellules tumorales. Suite à des travaux précliniques chez l'animal, la combinaison chimiothérapie (ciblant les cellules tumorales) et agent inhibiteur de la résorption osseuse (bisphosphonate ou anticorps anti-RANKL) laissait supposer une efficacité dans le contrôle de la progression tumorale et l'apparition de métastases²⁴. Ainsi, un essai clinique randomisé de phase III (OS2006) a été ouvert en France en 2007 associant le Zometa® (acide zolédronique, bisphosphonate de 3ème génération) à la chimiothérapie conventionnelle et à la chirurgie pour les patients pédiatriques et adultes atteints d'OS. Cet essai a été suspendu et les inclusions arrêtées en 2014 pour cause de futilité (Piperno S. et al., Lancet Oncol, sous presse).

1.1.8. Facteurs pronostiques

Malgré la recherche de nouveaux facteurs pronostiques qui permettraient de définir la meilleure stratégie thérapeutique, les deux principaux facteurs utilisés restent la réponse à la chimiothérapie et la présence ou non de métastase au moment du diagnostic.

1.1.8.1. Réponse à la chimiothérapie

La réponse à la chimiothérapie néoadjuvante est le principal facteur pronostique. Son évaluation est basée sur la classification de Huvos et Rosen²² et permet d'adapter la chimiothérapie adjuvante en cas de mauvaise réponse.

1.1.8.2. Métastases

Environ 15 à 20 % des OS sont métastatiques au diagnostic. Les métastases sont pulmonaires dans plus de la moitié des cas. Elles peuvent aussi être osseuses, sur le même os (skip métastase) ou à distance. Dans plus d'un tiers des cas, les métastases sont multiples.

La présence de métastase(s) fait chuter le taux de survie globale à 5 ans à 30%. Les skip métastases et les métastases pulmonaires uniques sont toutefois de meilleur pronostic car elles sont accessibles à la chirurgie.²⁶

1.1.8.3. Autres facteurs pronostiques

Les autres facteurs pronostiques reconnus sont l'âge, la localisation tumorale et la taille tumorale. Plusieurs études ont évoqués de nouveaux marqueurs pronostiques potentiels. Cependant aucun n'est actuellement utilisé en pratique.

1.2. L'hypoxie

Au sein de nombreuses tumeurs dont les OS, la présence de zones hypoxiques entraîne le développement d'une néovascularisation tumorale, d'un phénotype tumoral plus agressif et est associée à un mauvais pronostic et à une résistance aux traitements (chimiothérapie et radiothérapie).

1.2.1. Définition

L'hypoxie correspond à la diminution de la pression partielle en oxygène normale dans les tissus. Elle survient lors de certaines pathologies aiguës ou chroniques, telles que des pathologies vasculaires ou pulmonaires, et en cas de cancer. Lorsqu'elle est sévère ou prolongée, l'hypoxie peut entraîner la mort cellulaire. L'hypoxie est également un phénomène physiologique puisqu'elle est présente lors de l'embryogenèse et participe notamment au développement de la vascularisation et de l'hématopoïèse.^{27,28}

La pression partielle en oxygène diminue à mesure que l'on s'éloigne d'un vaisseau, créant un gradient d'hypoxie. Des études ont montré que des cellules situées à plus de 180 µm d'un vaisseau sanguin ne pouvaient survivre. Au-delà de cette distance, l'oxygène est en effet entièrement métabolisé.

1.2.2. Biologie de l'hypoxie

1.2.2.1. Les facteurs HIF

Le facteur clé de la réponse cellulaire à l'hypoxie est HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1). Il s'agit d'un hétérodimère composé des sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β (aussi connue sous le nom d'ARNT pour aryl hydroxycarbon receptor nuclear translocator). La sous-unité HIF-1 α est régulée par le taux d'oxygène, tandis que la sous-unité HIF-1 β est exprimée de façon constitutive.

En condition normale d'oxygène, HIF-1 α est hydroxylé par une prolyl hydroxylase. Il va alors se lier à la protéine Von Hippel Lindau (pVHL) et être ubiquitinylé. Le signal ubiquitine va entraîner son adressage au protéasome où il sera dégradé.

En l'absence d'oxygène, les prolyl hydroxylases sont inactives et HIF-1 α n'est donc pas dégradé. La stabilisation de HIF-1 α permet son accumulation dans le cytoplasme, sa translocation au noyau et sa dimérisation avec la sous-unité constitutive HIF-1 β , pour constituer le facteur HIF-1. Celui-ci se fixe au niveau des séquences de réponse à l'hypoxie HRE (Hypoxia Response Element) 5'-TACGTGCT-3', présentes dans les promoteurs de certains gènes, dont la transcription est ainsi activée.

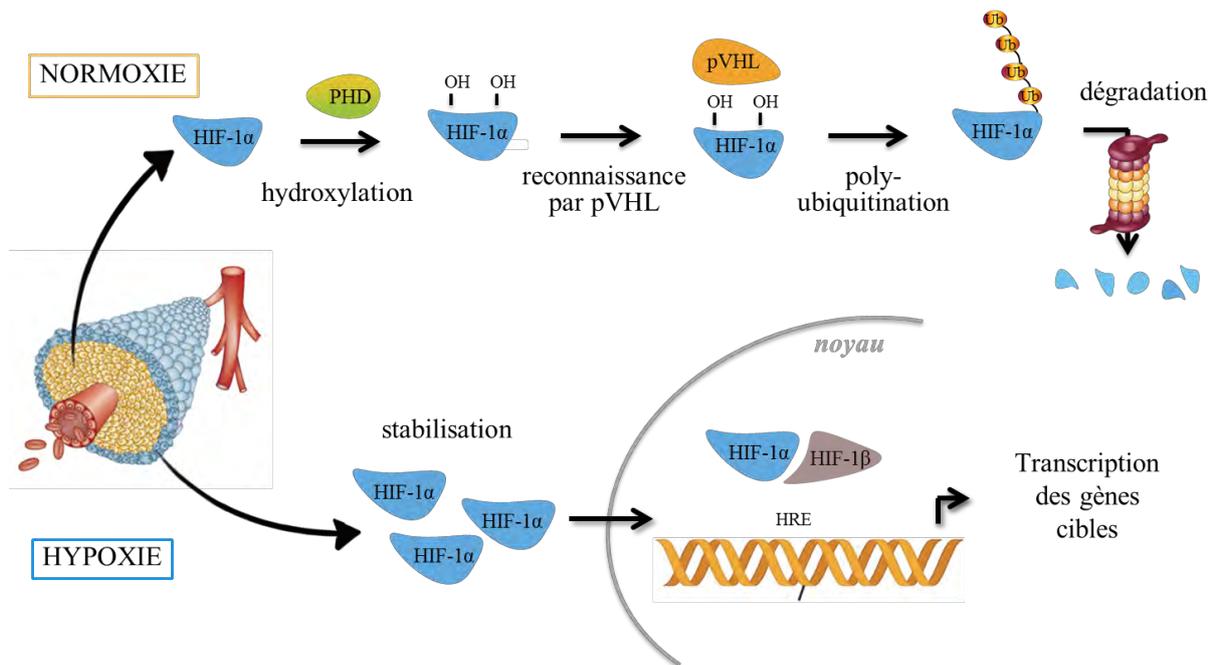


Figure 8. Métabolisme de HIF-1 α en condition normale d'oxygène et en hypoxie (d'après Harris et al., 2002²⁹ et Ader et Cuvillier, 2010³⁰)

Les facteurs HIF-2 et HIF-3 sont constitués de la sous-unité HIF-1 β , associée à la sous-unité HIF-2 α ou HIF-3 α respectivement. HIF-1 α est un facteur exprimé de façon ubiquitaire, contrairement à HIF-2 α et HIF-3 α dont l'expression est tissu-dépendante.

1.2.2.2. Les gènes cibles de HIF-1

Le facteur HIF-1 est un facteur de transcription. Ses gènes cibles sont impliqués dans diverses fonctions cellulaires telles que l'angiogenèse (VEGF, vascular endothelial growth factor), le métabolisme glucidique (GLUT-1, glucose transporter-1), la régulation du pH (CA-IX, carbonic anhydrase IX), la prolifération et la survie cellulaire. Ils sont résumés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Principaux gènes cibles du facteur HIF-1 (d'après Harris et al. 2002)²⁹

Fonction cellulaire	Gènes
Transport de l'oxygène et métabolisme du fer	érythropoïétine, transferrine, céruléoplasmine
Angiogenèse	VEGF, PDGF- β , Ang-2, Tie-2, cyclooxygenase-2
Métabolisme du glucose	GLUT-1, GLUT-3, LDHA, PDK1, Hexokinase-1, Hexokinase-2
Régulation du pH	Carbonic anhydrase IX
Invasion et métastase	MMP, MET, LOX, CXCR4
Prolifération/survie	IGF-2, Cyclin D1, p21, TGF α , MDRI
Dédifférentiation	Oct-4
Transition épithélio-mésenchymateuse	Twist, snail

GLUT-1

Le *glucose transporter 1* (GLUT-1) est un transporteur spécifique du glucose, codé par le gène *SLC2A1*. Il permet le transport du glucose à travers la membrane plasmique des cellules. Il est fortement exprimé par les érythrocytes et les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique.

CA-IX

L'anhydrase carbonique IX (CA-IX) est une enzyme de la famille des métalloenzymes agissant en présence de zinc. Elle est codée par le gène *CA9* situé sur le chromosome 9. Il s'agit d'une protéine transmembranaire catalysant de façon réversible l'addition d'une molécule d'eau sur une molécule de dioxyde de carbone pour donner un acide carbonique.

1.2.3. Hypoxie et cancer

L'hypoxie est un élément caractéristique des tumeurs solides localement avancées.³¹ Elle est la conséquence de plusieurs mécanismes :

- un apport en O₂ limité par la perfusion, conséquence d'anomalies structurelles et fonctionnelles de la néovascularisation tumorale : c'est l'hypoxie aiguë,

- un apport en O₂ limité par la diffusion, dû à une augmentation des distances de diffusion et des besoins en oxygène accrus, secondaires à la prolifération non contrôlée des cellules tumorales : c'est l'hypoxie chronique,
- l'anémie, associée à la tumeur ou induite par les traitements, est un facteur d'hypoxie via la réduction de la capacité de transport de l'oxygène par le sang.

L'hypoxie est délétère à la fois pour les cellules normales et les cellules tumorales, mais ces dernières développent des mécanismes d'adaptation leur permettant de survivre. Au sein des tumeurs, la présence de zones hypoxiques entraîne le développement d'une néovascularisation tumorale, et de phénotypes tumoraux plus agressifs. De nombreuses études ont associé l'hypoxie à un plus mauvais pronostic et à une résistance aux traitements (chimiothérapie, radiothérapie et immunothérapie).³²

Les facteurs HIF sont surexprimés dans de nombreux cancers chez l'homme. Plusieurs études ont montré que la surexpression de HIF-1 α était associée à un plus mauvais pronostic, par exemple dans le cancer de l'œsophage, de l'estomac, du poumon, dans le cancer du sein³³ et dans les cancers de la tête et du cou.³⁴ Dans d'autres cancers comme le cancer du col utérin, l'impact pronostique de la surexpression de HIF-1 α n'est pas certain.^{35,36}

L'expression de certains gènes cibles de HIF-1 a également été étudiée. Il a été ainsi montré que la surexpression de GLUT-1 était associée, comme celle de HIF-1 α , à un plus mauvais pronostic dans le cancer du sein, les cancers ORL, du poumon, de l'œsophage, de l'estomac, du colon, de l'ovaire et de la vessie, ainsi que dans le cancer du col utérin.^{31,37} De même, la plupart des études associent la surexpression de CA-IX à une diminution de la survie.^{31,37} D'autres études ont rapporté une association entre un plus mauvais pronostic et la surexpression de gènes cibles de HIF tels que *VEGF* (vascular endothelial growth factor), *LOX* (lysyl oxidase) et *LDH-5* (lactate dehydrogenase isoenzyme-5).³⁸⁻⁴⁰

1.2.4. Hypoxie et résistance aux traitements

La résistance à la radiothérapie est la conséquence du manque d'oxygène. En effet, les radiations ionisantes agissent via la formation de radicaux libres oxygénés pour produire des cassures de l'ADN au sein des cellules tumorales.

La résistance à la chimiothérapie des cellules tumorales hypoxiques fait appel à plusieurs mécanismes. D'une part, la vascularisation tumorale est structurellement et fonctionnellement anormale. Elle est caractérisée par des vaisseaux tortueux, dilatés et perméables, et un flux sanguin hétérogène, à la fois dans le temps et dans l'espace.⁴¹ La délivrance de la chimiothérapie aux cellules tumorales via le flux sanguin est ainsi moins efficace. D'autre part, il se produit dans les cellules tumorales hypoxiques une régulation à la hausse de gènes de la famille des transporteurs ABC tels que multidrug resistance 1 (MDR1) et multidrug-associated protein 1 (MRP1). Ces protéines agissent comme des pompes d'efflux de drogues et permettent aux cellules tumorales d'éliminer les molécules de chimiothérapie.⁴² Enfin, la résistance à la chimiothérapie des cellules hypoxiques fait aussi appel à des mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire, d'inhibition de l'apoptose et d'inhibition des dommages à l'ADN.⁴³

1.2.5. Hypoxie et ostéosarcome

Comme dans de nombreux autres cancers, l'hypoxie est un facteur de mauvais pronostic dans les OS. Plusieurs études ont montré la surexpression des marqueurs de l'hypoxie, tels que HIF-1 α ou ses gènes cibles, parmi lesquels GLUT-1, VEGF et COX-2.⁴⁴ La surexpression de HIF-1 α est associée à une mauvaise réponse à la chimiothérapie et à un plus mauvais pronostic.⁴⁴ De plus, la voie de signalisation intégrine β 5/FAK/GSK3 β , impliquée dans l'hypoxie, est associée à une plus mauvaise réponse à la chimiothérapie.⁴⁵

In vitro, le facteur HIF-1 α est impliqué dans la résistance à la doxorubicine.⁴⁶ Il promeut en effet un phénotype de résistance multidrogue dans les cellules ostéosarcomateuses. De plus, l'hypoxie contribue à la migration des cellules ostéosarcomateuses et donc à la survenue de métastases par le biais de CXCR4.⁴⁷

L'hypoxie représente ainsi une cible thérapeutique potentielle dans les OS.

1.3. La voie sphingosine kinase 1 / sphingosine 1-phosphate / sphingosine 1-phosphate récepteur 1

1.3.1. Les acteurs de la voie SphK1/S1P/S1P1

Les sphingolipides sont des composants des membranes cellulaires mais sont également des lipides bioactifs, participant à la régulation de processus cellulaires fondamentaux. Le céramide, molécule centrale du métabolisme sphingolipidique, est impliqué notamment dans l'apoptose, la différenciation et l'inhibition de la croissance. A l'inverse, la sphingosine 1-phosphate (S1P) joue un rôle dans la prolifération cellulaire, la transformation et l'angiogenèse. Il existe une balance entre ces deux sphingolipides aux effets opposés, appelée biostat sphingolipidique, et régulée principalement par des enzymes, les sphingosine kinases (SphK, figure 9). Celles-ci catalysent la phosphorylation ATP-dépendante de la sphingosine en S1P. La sphingosine est produite par la conversion du céramide par la céramidase.

La transformation de la S1P peut se faire de façon réversible par les S1P phosphatases, participant ainsi au biostat sphingolipidique.

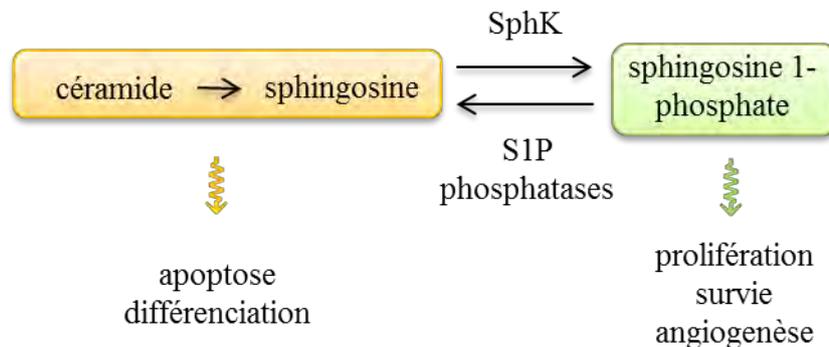


Figure 9. Le biostat sphingolipidique.

La S1P peut aussi être dégradée de façon irréversible par la S1P lyase en phosphoéthanolamine et hexadécénal, réutilisés par la suite pour la synthèse du phosphatidyléthanolamine.

1.3.1.1. Les sphingosine kinases

Les sphingosine kinases sont des enzymes constituées de cinq domaines hautement conservés au cours de l'évolution (figure 10). Elles comportent un domaine catalytique unique. Il en existe deux isoformes, la SphK1 et la SphK2 chez l'Homme. Elles ont des profils différents de localisation cellulaire et de distribution tissulaire, indiquant des fonctions distinctes.⁴⁸

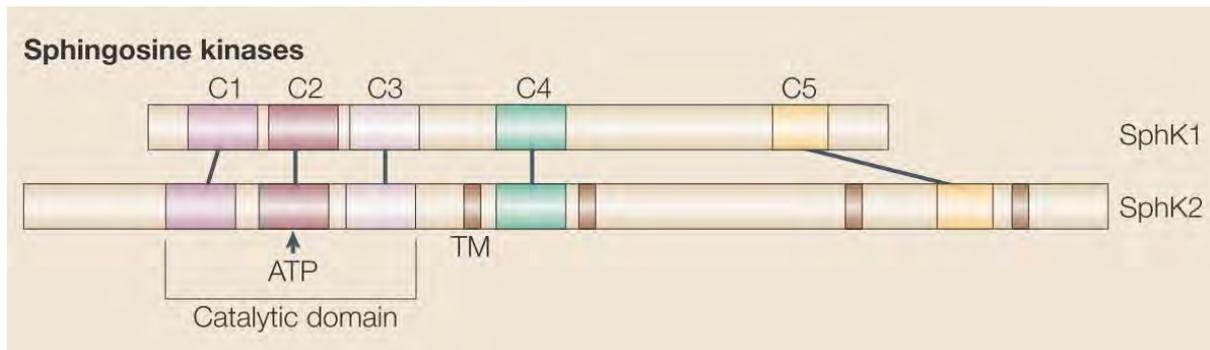


Figure 10. Structure des sphingosine kinases 1 et 2 (d'après Spiegel et al., 2003).

La sphingosine kinase 1

La sphingosine kinase 1 (SphK1) a été caractérisée par Pitson et al. en 2000.⁴⁹ Elle est codée par un gène situé sur le chromosome 17q25.2. C'est une enzyme ubiquitaire mais majoritairement exprimée dans les poumons et la rate.

Elle est située dans le cytoplasme des cellules mais peut être transloquée à la membrane plasmique. La SphK1 peut être phosphorylée par la kinase ERK1/2 sur le résidu Ser225. Ceci entraîne sa translocation membranaire mais aussi une augmentation de son activité.⁵⁰

Elle est régulée par de nombreux agonistes dont des facteurs de croissance, des cytokines et des hormones.⁵¹

La sphingosine kinase 2

La sphingosine kinase 2 est moins connue. Elle est exprimée majoritairement dans le foie et le cœur. Elle est principalement localisée dans le noyau des cellules. Elle est codée par un gène situé sur le chromosome 19q13.2.

1.3.1.2. La sphingosine 1-phosphate

La sphingosine 1-phosphate (S1P) est le produit de la phosphorylation de la sphingosine par l'une des deux sphingosine kinases. Il s'agit d'un sphingolipide bioactif impliqué dans la régulation de nombreux processus cellulaires, tels que la prolifération, la survie, l'angiogenèse, l'apoptose,⁵² mais aussi l'homéostasie calcique, la maturation vasculaire, le développement cardiaque et l'immunité.⁴⁸

En effet, l'augmentation du taux de S1P promeut la prolifération en stimulant la synthèse de l'ADN et en accélérant la transition G1-S au cours du cycle cellulaire.⁵³

La S1P peut se comporter comme un second messager intracellulaire par des mécanismes récemment décrits. La S1P intranucléaire se lie aux histone déacétylases HDAC1 et HDAC2 pour réguler épigénétiquement l'expression de gènes.⁵⁴ Il a été également montré que la S1P forme un complexe avec TRAF2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 2) et induit son activation, conduisant à l'augmentation du signal NF-κB.

Le mode d'action principal de la S1P est cependant extracellulaire. Elle peut en effet être excrétée et agir comme facteur de signalisation paracrine ou autocrine.⁵⁵

La S1P est excrétée via un transporteur transmembranaire de type ABC, spinster (Spn). Elle circule dans le sang associée à l'albumine ou à la protéine HDL. La S1P extracellulaire est le ligand naturel de récepteurs spécifiques appartenant à la famille des récepteurs couplés à la protéine G.

Le taux constitutif de S1P dans la plupart des tissus est bas, à l'exception des érythrocytes et des plaquettes qui ne possèdent pas de S1P lyase ni S1P phosphatase.⁵⁶

1.3.1.3. Les récepteurs de la sphingosine 1-phosphate

Cinq récepteurs de la S1P sont identifiés : S1P1 (aussi connu sous le nom de EDG-1 pour *Endothelial Differentiation Gene*), S1P2 (ou EDG-5), S1P3 (ou EDG-3), S1P4 (ou EDG-6) et S1P5 (ou EDG-8).

Leur expression diffère selon les tissus. Ils se lient à trois différentes protéines G : Gi, Gq et G12/13. Ils régulent ainsi de nombreuses voies de signalisation intracellulaires via PI3K, ERK, Rho par exemple. Le récepteur S1P1 est couplé à la protéine Gi.

1.3.2. Implication de la voie SphK1/S1P en pathologie

1.3.2.1. Dans le cancer

De nombreuses études ont montré le rôle important de la SphK1 dans le cancer. Elle semble en effet avoir un rôle « oncogène », bien qu'il n'ait pas été décrit de mutation du gène.⁵⁷

En effet, sa surexpression dans des fibroblastes induit leur transformation et la formation de tumeurs chez la souris *nude*.

La SphK1 est surexprimée dans de nombreux cancers chez l'Homme. Elle est associée à un plus mauvais pronostic. Sa surexpression a été corrélée avec une diminution de la survie chez des patients atteints de cancers de l'estomac, du sein ou du cerveau, et avec l'apparition de métastases.⁵⁸ Dans le cancer de la prostate, la surexpression de la SphK1 et l'augmentation de son activité sont corrélées avec un score de Gleason élevé.⁵⁹

De plus, il a été montré que plusieurs traitements anti-tumoraux (chimiothérapies et radiations ionisantes) diminuent l'activité de la SphK1 dans des lignées cellulaires cancéreuses et des modèles animaux.⁵⁸

L'activation de la SphK1, ou sa surexpression, entraîne une augmentation de la production de S1P. Le biostat sphingolipidique est ainsi déplacé en faveur de la S1P dans les cancers.

1.3.2.2. Dans l'inflammation

La S1P et ses récepteurs contrôlent la migration des leucocytes. Ils régulent la réponse allergique, la différenciation des lymphocytes, l'intégrité de la barrière endothéliale et l'expression de cytokines et de molécules d'adhésion.⁵⁶

1.3.3. Implication de la voie SphK1/S1P dans la régulation de l'hypoxie

Des études ont évoqué un lien entre la voie SphK1/S1P et l'hypoxie.⁴³ En effet, SphK1 est impliquée dans l'adaptation des cardiomyocytes à l'hypoxie dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. De plus, l'hypoxie augmente la prolifération de cellules musculaires lisses de façon dépendante de la S1P.

Dans le cancer, la SphK1 régule le taux de HIF-1 α en conditions hypoxiques. Cela a été montré dans des modèles tumoraux de glioblastome et de carcinomes (rénal, pulmonaire, mammaire et prostatique).⁶⁰ En hypoxie, il se produit des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui vont activer la SphK1. Celle-ci va produire de la S1P et activer la voie Akt/GSK3 β . Il en résulte une inhibition de la dégradation de HIF-1 α par le protéasome, sa stabilisation dans le cytoplasme de la cellule et sa translocation au noyau où il va activer la transcription des gènes cibles (figure 11).

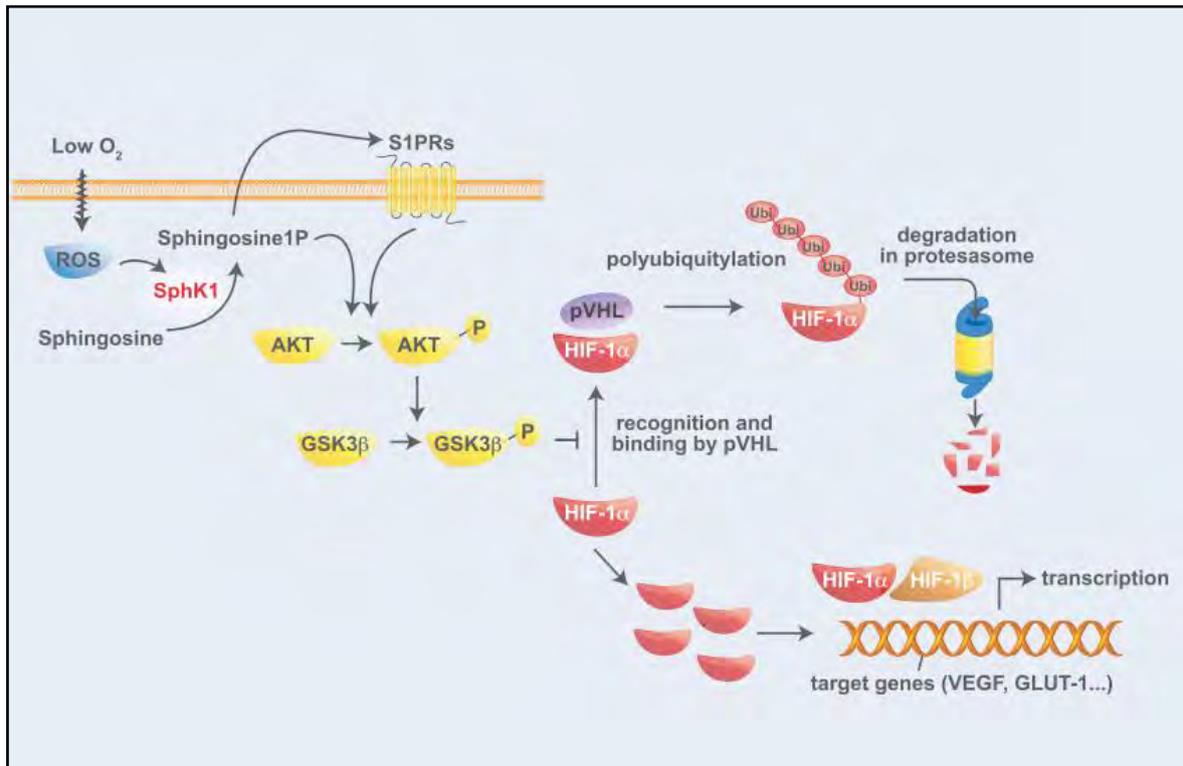


Figure 11. Régulation de HIF-1 α par la voie SphK1/S1P dans les cellules tumorales en hypoxie (Ader et al., 2009).⁶¹

1.3.4. Implication de la voie SphK1/S1P dans les ostéosarcomes

Une seule étude récente a montré le rôle de la SphK1 dans les OS. Elle a montré que la SphK1 était surexprimée dans cinq OS de patients. De plus, l'inhibition de la SphK1 induisait une chimiosensibilité et une diminution de la prolifération cellulaire dans la lignée U-2 OS.⁶²

1.3.5. Ciblage de la voie SphK1/S1P en thérapeutique

Plusieurs molécules ciblent la voie SphK1/S1P.

L'une d'elles est déjà utilisée chez les patients :

- le FTY720, aussi connu sous le nom de fingolimod, est un analogue synthétique de la sphingosine. Il est phosphorylé *in vivo* par la SphK2 et se lie aux récepteurs de la S1P à l'exception du S1P2. Il est approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement de la sclérose en plaque. Il agit alors sur les lymphocytes T mémoire centraux, sans affecter les lymphocytes T mémoire périphériques. Dans le cancer, il a été montré que le FTY720 réduisait la croissance tumorale et la survenue de métastase *in vivo*.⁶³ Un essai clinique de phase 0 est en cours dans les gliomes de haut grade en association avec le témozolomide et la radiothérapie (clinicaltrials.gov NCT02490930).

D'autres sont en développement :

- le SphingomabTM (ou LT1009 pour la forme humanisée) est un anticorps monoclonal dirigé contre la S1P. *In vivo*, il a une action anti-tumorale dans de nombreux modèles tels que le cancer du sein, du poumon, de l'ovaire et le mélanome.⁶⁴ Le SphingomabTM a fait l'objet d'essais cliniques de phase I dans les cancers solides avancés (clinicaltrials.gov NCT00661414) et de phase II dans les cancers du rein non résécables ou réfractaires (clinicaltrials.gov NCT01762033), ainsi que dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Les résultats ne sont pas encore connus.
- le LX3305 est un inhibiteur de la S1P lyase, testé dans un essai de phase II chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (clinicaltrials.gov NCT01417052).

2. OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif principal de cette étude était de déterminer si la voie SphK1/S1P, impliquée dans la régulation de l'hypoxie dans des modèles tumoraux de cancers de la prostate, du sein, du poumon et du rein et de glioblastome, est également impliquée dans l'hypoxie intra-tumorale des OS.

Les objectifs secondaires étaient d'évaluer l'impact pronostique de la voie SphK1/S1P sur la réponse à la chimiothérapie, les métastases et la survie globale ou sans progression des patients atteints d'OS.

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Sélection des patients

Nous avons recueilli les données de trois séries de patients différentes :

1. La série « OS 2006 » est issue d'un essai de phase III, randomisé, ouvert et multicentrique. L'objectif de cet essai était d'évaluer l'effet d'un biphosphonate, le Zometa®, en association avec le traitement standard des OS de haut grade de l'enfant, de l'adolescent et de l'adulte. Notre étude a porté sur les patients inclus dans cet essai et suivis à Toulouse, Lille, Nantes ou Saint Cloud.
2. La série « OS hors 2006 » est une série rétrospective ayant porté sur les patients traités à Toulouse entre 2000 et 2013 pour un OS de haut grade de type conventionnel, à l'exception des patients inclus dans l'étude OS 2006.
3. La série « OS mandibule/maxillaire » est une série rétrospective multicentrique nationale, comprenant les patients chez lesquels a été diagnostiqué un OS de la mandibule ou du maxillaire supérieur entre 1996 et 2010 en France.

Les critères d'inclusion étaient les suivants :

- Diagnostic histopathologique d'OS conventionnel de haut grade selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS 2013), validé par le Groupe Français des Pathologistes experts Osseux (GFPO).

Les critères d'exclusion étaient :

- Diagnostic histopathologique d'OS de surface ou de bas grade
- Absence de données cliniques
- Absence de matériel disponible ou analysable

3.2. Recueil des données cliniques

Pour les patients suivis à Toulouse (série OS hors 2006), les données cliniques ont été recueillies à l'aide des logiciels informatiques de traitement du dossier médical Orbis et DPI (Dossier Patient Informatisé). Les données histopathologiques ont été recueillies à l'aide des logiciels Apix et Diamic.

Pour les patients de la série « OS 2006 », les données ont été collectées et obtenues auprès du centre investigateur de l'étude (Laurence Brugières - Institut Gustave Roussy, Villejuif).

Les données cliniques concernant les patients de la série « OS mandibule/maxillaire » avaient été recueillies pour une étude précédente.⁶⁵

Pour chaque patient, les données suivantes ont été recueillies :

- Date de naissance et âge au diagnostic
- Sexe
- Localisation de l'OS
- Date du diagnostic (date de la biopsie, ou, si non disponible et en l'absence de chimiothérapie néoadjuvante, date de la chirurgie)
- Date de la chirurgie
- Chimiothérapie : néoadjuvante et/ou adjuvante, type de chimiothérapie
- Evolution : rémission complète, récurrence locale, évolution métastatique, décès
- Date des dernières nouvelles et durée du suivi

Les données histopathologiques suivantes ont été recueillies :

- Sous-type histologique
- Evaluation de la réponse à la chimiothérapie selon le grade de Huvos et Rosen en cas de chimiothérapie néoadjuvante

L'étude a été réalisée dans le respect des lois de bioéthique.

3.3. Tissue micro array

Les tissue microarrays (TMA) ont été réalisés à partir de blocs archivés d'OS provenant de biopsies primaires ou d'exérèses chirurgicales, avant tout traitement. Les échantillons tumoraux étaient fixés en formol et inclus en paraffine. Pour chaque tumeur, trois carottes de 1 mm de diamètre étaient incluses dans les TMA. Les TMA ont été réalisés à la plateforme d'histopathologie de Purpan.

3.4. Immunohistochimie

3.4.1. Protocole technique

L'étude immunohistochimique a été réalisée sur des coupes de 4 µm d'épaisseur à partir des blocs de TMA, à l'aide du kit EnVision™ FLEX (Dako). Les lames ont été déparaffinées et réhydratées par des bains successifs de xylène et d'alcools de concentrations décroissantes. Un démasquage des épitopes a été réalisé par chauffage dans un bain-marie à 95°C, dans une solution de citrate (pH 6) pendant 30 minutes. Un blocage des peroxydases endogènes a été effectué par incubation avec du peroxyde d'hydrogène à 3% pendant 20 minutes. L'incubation avec l'anticorps primaire a été effectuée pendant 1h. Les lames ont ensuite été incubées pendant 30 minutes avec une solution contenant des polymères de dextrane couplés à des molécules d'anticorps secondaires de chèvre anti-souris ou anti-lapin et des molécules de peroxydase. La révélation a été réalisée avec du DAB (3,3'-diaminobenzidine), puis une contre-coloration a été effectuée avec de l'hématoxyline pendant 20 minutes. Pour chaque anticorps, des contrôles négatifs (sans anticorps primaire) et positifs étaient réalisés.

Tableau 4. Anticorps utilisés en immunohistochimie et conditions d'utilisation.

Cible	Fournisseur	Dilution	Localisation du marquage	Origine	Conditions d'utilisation (démasquage, durée incubation anticorps primaire)
GLUT-1	Abcam	1/200	membranaire	lapin monoclonal	Citrate, 1h
SphK1	S. Pitson	1/300	cytoplasmique	lapin monoclonal	Citrate, 1h
S1P1	F. Talmont	1/100	membranaire et cytoplasmique	souris monoclonal	Citrate, 1h

3.4.2. Interprétation

L'analyse des TMA a été effectuée selon le score d'immunomarquage IRS (ImmunoReactive Score), prenant en compte l'intensité du marquage (0 ; 1 = intensité faible ; 2 = intensité

modérée ; 3 = intensité marquée) et le pourcentage de cellules marquées (0% ; 1 = moins de 10% ; 2 = 10 à 50% ; 3 = 50 à 80% ; 4 = plus de 80%). Le score IRS correspond au produit de l'intensité du marquage et du pourcentage de cellules marquées.

Tableau 5. Score d'immunomarquage IRS, en fonction de l'intensité du marquage et du pourcentage de cellules marquées.

		Intensité			
		0	1+	2+	3+
Pourcentage de cellules marquées	0	0	0	0	0
	1 à 9%	0	1	2	3
	10 à 50%	0	2	4	6
	51 à 80%	0	3	6	9
	81 à 100%	0	4	8	12

Les marquages ont été interprétés indépendamment par deux pathologistes (AGB-CI). En cas de discordance, une nouvelle lecture a été effectuée afin d'arriver à un consensus.

Pour certains patients, plusieurs échantillons étaient disponibles, pouvant correspondre à la biopsie initiale ou à la pièce opératoire. Nous avons retenu en priorité pour nos analyses les prélèvements issus de la biopsie initiale, afin de limiter les prélèvements décalcifiés.

3.5. Dosage de l'activité enzymatique de la sphingosine kinase 1

Les échantillons tissulaires ont été homogénéisés puis repris dans un tampon de lyse (Tris-HCl pH 7,4 20 mM ; glycérol 20% ; β -mercaptoéthanol 1 mM ; EDTA 1 mM ; NaF 15 mM ; 4-desoxyridoxine 0,5 mM ; β -glycérophosphate 40 mM ; 10 μ g/mL leupeptine ; 10 μ L/mL aprotinine) auquel ont été ajoutés extemporanément 1 mM de sodium orthovanadate et 1 mM de phénylméthylsulfonyl fluoride. Les échantillons ont été lysés par 5 cycles de congélation dans l'azote liquide / décongélation dans l'eau à température ambiante / vortex. Les lysats ont été centrifugés à 13200 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Après dosage selon la méthode de Bradford, 150 μ g de protéines ont été repris dans le tampon de lyse avec 10 μ l de sphingosine (1 mM), de l'ATP froid (20 mM), du MgCl₂ et de l'ATP γ [P32]. Les échantillons ont été incubés pendant 30 minutes à 37°C. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 20 μ l de HCl 1N, 800 μ l de CHCl₃/MeOH/HCl (100/200/1), 240 μ l de CHCl₃ et 240 μ l de KCl 2N. Après centrifugation pendant 10 minutes à 600g, la phase inférieure organique a été récupérée et 900

µl de solution de lavage ont été ajoutés (MeOH/CHCl₃/KCl 2N/HCl 2N (53/51/24/20/2)). Une centrifugation pendant 10 minutes à 600g a permis de récupérer 400 µL de la phase organique. Une évaporation sur la nuit a été réalisée.

Les échantillons ont été repris dans 40 µL d'une solution de CHCl₃/MeOH (2/1). La séparation des différents composés a été réalisée par chromatographie sur couche mince sur plaque de silice grâce à un tampon de migration 1-butanol/méthanol/acide acétique/eau (80/20/10/20) pendant 3h30. Les composés radiomarqués ont été visualisés par autoradiographie. La silice contenant la S1P a été récupérée par grattage et la radioactivité a été quantifiée à l'aide d'un compteur à scintillation (Packard modèle TRICARB 1900TR). L'expérience a été réalisée par le Dr A. Ledoux.

3.6. Analyse statistique

L'analyse de la corrélation entre les différents marqueurs a été effectuée avec le test de corrélation de Spearman. La comparaison entre les groupes a été faite avec le test du Chi² ou le test exact de Fisher (lorsque le nombre de sujets était inférieur à 5) pour les variables qualitatives. Pour les variables quantitatives, la comparaison entre les groupes a été réalisée avec le test de Mann-Whitney. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs lorsque $p < 0,05$. La survie globale a été estimée par la méthode de Kaplan-Meier. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad 7.00.

3.7. *In vitro*

3.7.1. Lignées cellulaires

La lignée U-2 OS est issue d'une tumeur primaire d'OS. Elle a été cultivée dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal (HyClone) décomplémenté, dans un incubateur humidifié à 37°C et 5% de CO₂.

Les conditions d'hypoxie ont été obtenues en plaçant les cellules dans un incubateur (InVivo₂ 400, Ruskinn) à 37°C et en atmosphère pauvre en oxygène (0,1% O₂, 5% CO₂ et 94,9% N₂).

3.7.2. Réactifs

Les inhibiteurs pharmacologiques SKi, inhibiteur de la SphK1 et de la SphK2,⁶⁶ et PF-543, inhibiteur spécifique de la SphK1,⁶⁷ ont été fournis par Calbiochem. Les cellules ont été

traitées avec le SKi (concentration finale de 5 μ M ou 10 μ M) ou le PF-543 (concentration finale de 100 nM ou 500 nM) et placées en hypoxie pendant 6h. Les inhibiteurs ont été dilués dans du DMSO (Sigma).

3.7.3. Western-blot

Après lavage au PBS (Euromedex), les cellules ont été récupérées par grattage, puis centrifugées à 600 g pendant 7 min à 4°C. Les culots cellulaires ont ensuite été repris dans un tampon de lyse (0,1% triton ; 50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 5 mM EDTA) auquel ont été ajoutés extemporanément du sodium orthovanadate (1 mM) et des inhibiteurs de protéase (Protease Inhibitor Cocktail 1 mM, Sigma). La lyse a été effectuée à 4°C pendant 35 min en vortexant toutes les 5 minutes. Les lysats ont été centrifugés à 16 000 g pendant 10 minutes. La concentration en protéine des surnageants a été dosée selon la méthode de Bradford (kit BioRad Protein Assay) par mesure de la densité optique à 595 nm. 80 μ g de protéines ont été mélangés avec du tampon de lyse et du tampon de charge 5X (Tris/HCl pH 6,8 62,5 mM ; SDS 2% ; glycérol 20% ; β -mercaptoéthanol 50 mM ; bleu de bromophénol 0,1%). Les protéines ont été dénaturées pendant 5 minutes à 95°C. Les échantillons ont été déposés sur un gel SDS-PAGE contenant 10% d'acrylamide pour électrophorèse, puis transférés sur une membrane de nitrocellulose (Amersham) pendant 1h30 à 250 mA. La membrane a été saturée par une solution de TBS-Tween et lait (5%) pendant 60 minutes puis incubée avec l'anticorps primaire anti-HIF-1 α (tableau 6) dilué au 1/1000^e pendant 14h. Après lavage au TBS-T, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé à une peroxydase HRP (horse radish peroxydase), dilué au 1/5000^e (Biorad). La révélation se fait par chemoluminescence (ECL, Amersham GE Healthcare). La normalisation a été effectuée avec l'anticorps anti- α tubuline (Santa Cruz, sc-32293) dilué au 1/10000^e. La quantification a été réalisée avec le logiciel ImageJ.

Tableau 6. Anticorps utilisés en Western-blot et conditions d'utilisation.

Protéine cible	Fournisseur	Origine	Conditions d'utilisation
HIF-1 α	BD Bioscience	souris	1/1000, TBS-T 0,1%, 1% BSA
α -tubuline	SantaCruz	souris	1/10000, TBS-T 0,1%, 1% BSA
Ig souris-HRP	Biorad	chèvre	1/5000, TBS-T 0,1%, 1% lait

3.7.4. Transfection par les siRNA

La transfection a été réalisée dans de l'OptiMEM (Gibco) supplémenté avec 5% de glutamine, à l'aide de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur.

Le siRNA dirigé contre l'ARNm de la SphK1 (Eurogentec) a pour séquence 5'-GGGCAAGGCCUUGCAGCUC-3'. Il a été utilisé à des concentrations finales de 20, 50 et 75 nM. Le siRNA scramble a une séquence aléatoire et ne s'hybride avec aucun ARNm humain.

La transfection a eu lieu lorsque la confluence atteignait 30 à 50% selon les recommandations du fournisseur. La Lipofectamine 2000 et le siRNA ont été dilués dans de l'OptiMEM séparément, puis mélangés et incubés pendant 5 minutes à température ambiante. 1 ml du mélange a été ajouté au milieu de culture. Les cellules ont été récupérées par grattage 48h après la transfection, après avoir été placées en hypoxie (0,1% O₂) pendant 6h.

3.8. In vivo

3.8.1. Modèle animal

Une xénogreffe hétérotopique a été réalisée chez une souris *nude* à partir de cellules de la lignée ostéosarcomateuse humaine MG63. La souris a reçu une injection de pimonidazole avant d'être euthanasiée. La tumeur sous-cutanée a été prélevée et fixée en formol puis incluse en paraffine.

3.8.2. Immunohistochimie

Des marquages immunohistochimiques ont été réalisés à l'aide des anticorps anti-pimonidazole et anti-SphK1 selon le protocole précédemment décrit.

4. RESULTATS

4.1. Chez les patients

4.1.1. Données cliniques

201 cas d'OS de haut grade ont été inclus dans les TMA. Ces cas correspondaient à 167 patients.

66 patients ont été exclus de notre étude. 5 patients (7,6%) ont été exclus en raison du diagnostic d'OS non conventionnel (OS à petites cellules, OS de surface de haut grade). Les autres patients ont été exclus en raison de limites techniques : 24 cas (36,4%) ont été exclus pour décollement du tissu de la lame, et 37 (56,0%) pour marquage non interprétable.

Au total, notre étude a porté sur 101 patients toutes séries confondues. Les patients se répartissaient de la manière suivante : 39 patients dans la série nationale OS 2006, 38 patients dans la série toulousaine OS hors 2006 et 24 patients dans la série nationale OS mandibule/maxillaire. Les données cliniques ont été analysées et les caractéristiques de la population de notre étude sont résumées dans le Tableau 7.

Les 101 patients de notre étude étaient âgés de 5,7 à 83,9 ans. Dans l'ensemble des cas, l'âge moyen était de 31,9 ans et l'âge médian de 22,6 ans. Les patients de la série OS 2006 étaient globalement plus jeunes, avec un âge moyen de 17,2 ans (âge médian de 15,6 ans). Les patients de la série OS mandibule/maxillaire étaient globalement plus âgés, avec un âge moyen de 53,8 ans (âge médian de 55,6 ans).

Il existait une légère prédominance masculine avec un sex ratio de 1,2 : 1 dans l'ensemble des cas. Cette prédominance masculine était retrouvée dans les trois séries.

L'OS était de type ostéoblastique pour 33 patients (59%), de type chondroblastique pour 16 patients (29%) et de type fibroblastique pour 7 patients (13%). Dans 45 cas, le sous-type histologique n'était pas précisé (OS SAI, sans autre indication).

73 patients (72,3%) ont bénéficié d'une chimiothérapie néoadjuvante. Parmi eux, 44 (60,3%) ont reçu une chimiothérapie à base de Méthotrexate à haute dose. 29 patients (39,7%) ont été traités selon le protocole API-AI.

28 patients (27,7%) ont été opérés d'emblée, et ont reçu une chimiothérapie adjuvante sans avoir reçu au préalable une chimiothérapie néoadjuvante. L'une des raisons est la survenue d'une fracture pathologique révélatrice ou au décours du diagnostic.

En dehors de la série OS mandibule/maxillaire comprenant 24 patients, notre série comptait 37 patients (48,1%) atteints d'un OS localisé au fémur, dont 31 cas à l'extrémité inférieure (40,3%), 4 cas à l'extrémité supérieure (5,2%), 1 cas sur la diaphyse (1,3%) et 1 cas non précisé (1,3%). Les autres localisations les plus touchées étaient l'extrémité supérieure de l'humérus (10 patients, 13%), le tibia (9 patients, 11,7%, dont 8 cas à l'extrémité supérieure et 1 cas à l'extrémité inférieure), la fibula (2 patients, 2,6%).

Les localisations peu fréquentes dans notre série étaient : le coude (1 patient, 1,3%), le rachis (2 patients, 2,6%), le bassin (2 patients, 2,6%), l'omoplate (1 patient, 1,3%), le ptérion (1 patient, 1,3%), et le sternum (1 patient, 1,3%). Dans 11 cas (14,3%), la localisation n'était pas précisée.

Tableau 7. Résumé des caractéristiques cliniques des patients.

		Population totale	OS 2006	OS hors 2006	OS Mandibule/ maxillaire
<i>n</i> =		101	39	38	24
Age moyen		31,9	17,2	35,8	53,8
Age médian		22,6	15,6	30,5	55,6
(extrêmes)		(5,7-83,9)	(5,7-50,4)	(8,1-82,8)	(17,3-83,9)
Sexe	Femme	46 (45,5%)	19 (48,7%)	17 (44,7%)	10 (41,7%)
	Homme	55 (54,5%)	20 (51,3%)	21 (55,3%)	14 (58,3%)
Localisation	Fémur	37 (36,6%)	21 (53,8%)	16 (42,1%)	-
	Humérus	10 (9,9%)	5 (12,8%)	5 (13,2%)	-
	Tibia	9 (8,9%)	2 (5,1%)	7 (18,4%)	-
	Autre	45 (44,5%)	11 (28,2%)	10 (26,3%)	24 (100%)
Sous-type histologique	Ostéoblastique	33 (59%)	17 (56,7%)	16 (61,5%)	-
	Chondroblastique	16 (29%)	10 (33,3%)	6 (23,1%)	-
	Fibroblastique	7 (12%)	3 (10%)	4 (15,4%)	-
	OS conventionnel (SAI)	45	9	12	24
Traitement	Chirurgie première	28 (27,7%)	5 (14,7%)	12 (31,6%)	11 (45,8%)
	Chimiothérapie néoadjuvante	73 (72,3 %)	34 (87,2%)	26 (68,4%)	13 (54,2%)
Réponse à la chimiothérapie	Bonne	42 (57,5%)	27 (79,4%)	11 (42,3%)	4 (30,8%)
	Mauvaise	31 (42,5%)	7 (20,6%)	15 (57,7%)	9 (69,2%)
Récidive	Locale	21 (20,8%)	6 (15,4%)	12 (31,6%)	3 (12,5%)
	Métastatique	38 (37,6%)	15 (38,5%)	19 (50%)	4 (16,7%)
Décès		38 (37,6%)	14 (35,9%)	16 (42,1%)	8 (33,3%)
Délai de survenue du décès (mois)		33,5	33,2	28,8	43,8
Suivi moyen (mois)		46,2	44,6	49,0	42,8

4.1.2. Données phénotypiques

La répartition des scores d'immunomarquage IRS évaluant l'expression des marqueurs GLUT-1, SphK1 et S1P1 en immunohistochimie, est résumée dans le tableau 8. La médiane du score IRS pour le marqueur GLUT-1 était de 6. La médiane de l'IRS était de 4 pour le marqueur SphK1 et de 3 pour S1P1.

Tableau 8. Expression des marqueurs GLUT-1, SphK1 et S1P1 selon le score d'immunomarquage IRS.

IRS	GLUT-1		SphK1		S1P1	
	effectifs	%	effectifs	%	effectifs	%
0	19	18,8	12	11,9	2	2,0
1	0	0	0	0	0	0
2	4	4,0	4	4,0	22	21,8
3	0	0	32	31,7	32	31,7
4	8	7,9	5	5,0	5	5,0
6	23	22,8	30	29,7	29	28,7
8	0	0	15	14,9	7	6,9
9	35	34,7	1	1,0	1	1,0
12	12	11,9	2	2,0	3	3,0
<i>total</i>	<i>101</i>	<i>100%</i>	<i>101</i>	<i>100%</i>	<i>101</i>	<i>100%</i>

L'examen immunohistochimique montrait un marquage membranaire avec l'anticorps anti-GLUT-1, et un marquage cytoplasmique avec les anticorps anti-SphK1 et anti-S1P1 (figure 12).

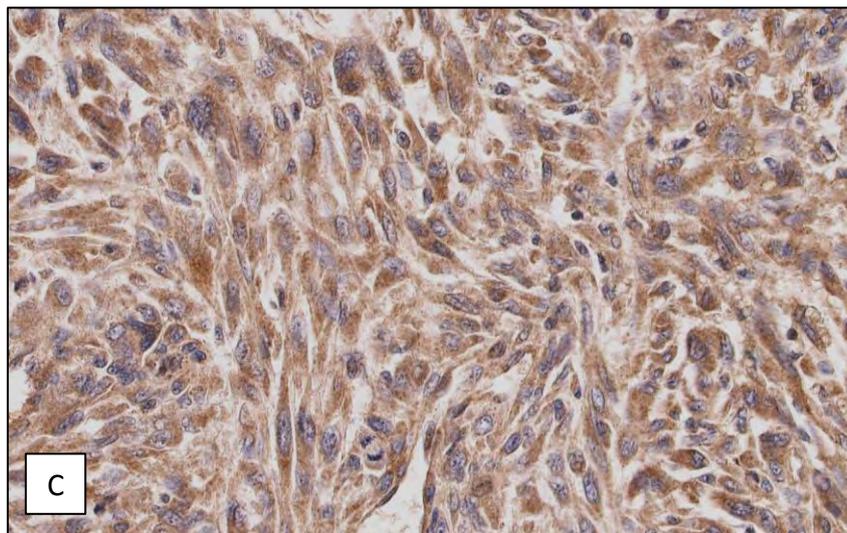
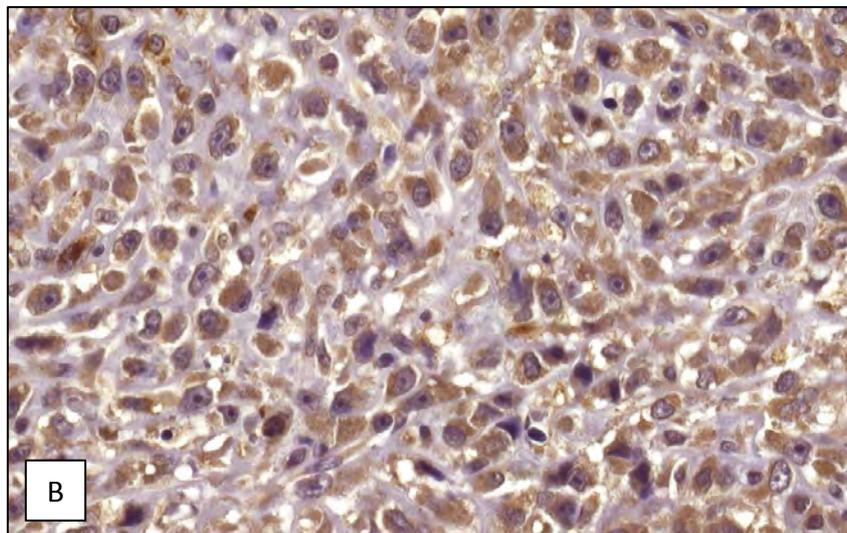
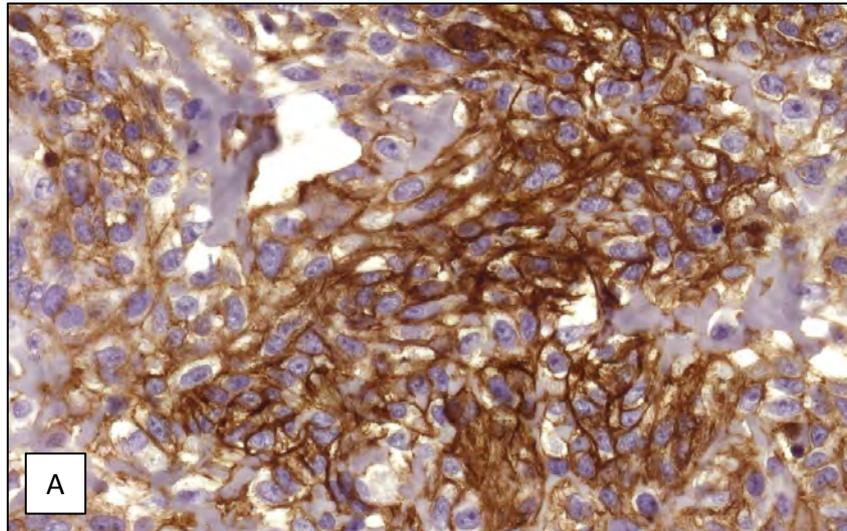


Figure 12. Exemples de marquages immunohistochimiques.

A. Marquage membranaire avec l'anticorps anti-GLUT-1 (x40). B. Marquage cytoplasmique avec l'anticorps anti-SphK1 (x40). Marquage cytoplasmique avec l'anticorps anti-S1P1 (x40).

4.1.3. Corrélation entre les marqueurs

L'expression de GLUT-1 est corrélée à celle de la SphK1 dans chacune des trois séries. Dans la série OS 2006, nous observons également une corrélation entre l'expression de la SphK1 et celle de S1P1.

Série OS hors 2006

L'expression de GLUT-1 était statistiquement liée à celle de la SphK1 avec un coefficient $r_s=0,39$ ($p=0,016$). L'expression de S1P1 n'était pas statistiquement liée à celle de GLUT-1 ($r_s=0,09$, $p=0,58$) ni à celle de SphK1 ($r_s=0,009$, $p=0,96$).

Série OS 2006

L'expression de la SphK1 était statistiquement liée à celle de GLUT-1 avec un coefficient $r_s=0,35$ ($p=0,027$) et à celle de S1P1 avec un coefficient $r_s=0,44$, ($p=0,005$). L'expression de S1P1 n'était pas statistiquement liée à celle de GLUT-1 ($r_s=0,16$, $p=0,34$).

Série OS mandibule/maxillaire

L'expression de GLUT-1 était statistiquement liée à celle de la SphK1 avec un coefficient $r_s=0,50$ ($p=0,014$). L'expression de S1P1 n'était pas statistiquement liée à celle de GLUT-1 ($r_s=-0,02$, $p=0,94$) ni à celle de SphK1 ($r_s=0,13$, $p=0,56$).

4.1.4. Réponse à la chimiothérapie

4.1.4.1. Facteurs cliniques

Dans l'ensemble des cas, la réponse à la chimiothérapie était meilleure chez les patients âgés de moins de 18 ans. Nous avons en effet observé 76% de bonne réponse parmi les patients âgés de moins de 18 ans, contre 37% chez les patients adultes (tableau 9). Cet impact pronostique de l'âge était retrouvé dans les trois séries.

Tableau 9. Influence des paramètres cliniques sur la réponse à la chimiothérapie.

Réponse à la chimiothérapie (n = 73)	MAUVAISE REPONSE		BONNE REPONSE		<i>p</i>
	n = 31	%	n = 42	%	
Age					<i>0.0007***</i>
	<i>< 18 ans</i>	9	24%	29	76%
	<i>≥ 18 ans</i>	22	63%	13	37%
					<i>0.003**</i>
	<i>< 25 ans</i>	14	30%	33	70%
	<i>≥ 25 ans</i>	17	65%	9	35%
Sexe					<i>ns</i>
	<i>Femmes</i>	13	43%	17	57%
	<i>Hommes</i>	18	42%	25	58%

*ns = non significatif, ** = p < 0.01, *** = p < 0,001*

4.1.4.2. Marqueurs immunohistochimiques

Nous avons analysé la corrélation entre l'expression des marqueurs GLUT-1, SphK1 et S1P1 en immunohistochimie et la réponse à la chimiothérapie, pour chacune des séries.

Nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre la réponse à la chimiothérapie d'une part, et l'expression des marqueurs GLUT-1, SphK1 ou S1P1 d'autre part.

La répartition des scores d'immunomarquage en fonction de la réponse à la chimiothérapie est détaillée dans le Tableau 10.

Tableau 10. Corrélation entre l'expression des marqueurs évaluée selon l'IRS et la réponse à la chimiothérapie, pour chacune des trois séries.

	Marqueurs	Bons répondeurs	Mauvais répondeurs	<i>p</i>
OS hors 2006	GLUT-1			<i>0,69</i>
	Médiane IRS	9	6	
	(extrêmes)	(0-12)	(0-12)	
	SphK1			<i>0,74</i>
	Médiane IRS	6	6	
	(extrêmes)	(0-8)	(0-8)	
	S1P1			<i>0,55</i>
	Médiane IRS	3	6	
	(extrêmes)	(2-12)	(0-12)	
OS 2006	GLUT-1			<i>0,07</i>
	Médiane IRS	9	4	
	(extrêmes)	(0-12)	(0-12)	
	SphK1			<i>0,43</i>
	Médiane IRS	4	3	
	(extrêmes)	(0-12)	(3-8)	
	S1P1			<i>0,31</i>
	Médiane IRS	3	2	
	(extrêmes)	(2-6)	(0-6)	
OS Mandibule	GLUT-1			<i>0,22</i>
	Médiane IRS	9	6	
	(extrêmes)	(6-9)	(0-9)	
	SphK1			<i>0,92</i>
	Médiane IRS	3	3	
	(extrêmes)	(2-8)	(0-8)	
	S1P1			<i>0,98</i>
	Médiane IRS	5	6	
	(extrêmes)	(3-8)	(2-9)	

4.1.5. Survie

Nous n'avons pas retrouvé de différence statistiquement significative en termes de survie, globale ou sans progression, entre les OS avec une expression nulle à faible et les OS avec une expression modérée à forte. Pour définir les deux groupes, nous avons arbitrairement choisi une valeur seuil correspondant à la médiane du score d'immunomarquage IRS pour chaque marqueur. La médiane de l'IRS était de 6 pour GLUT-1, de 4 pour SphK1 et de 3 pour S1P1.

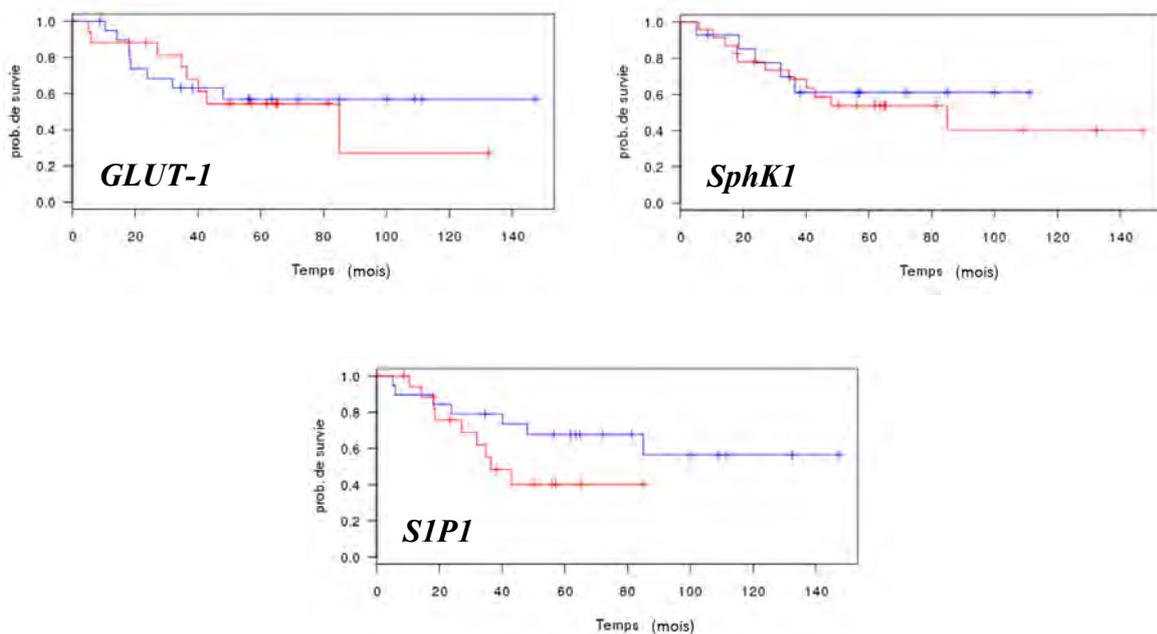


Figure 13. Survie globale dans la série OS hors 2006 en fonction de l'expression de GLUT-1, de la SphK1, ou de S1P1.

bleu : expression nulle à faible (IRS inférieur à la médiane) ; rouge : expression modérée à forte (IRS supérieur à la médiane).

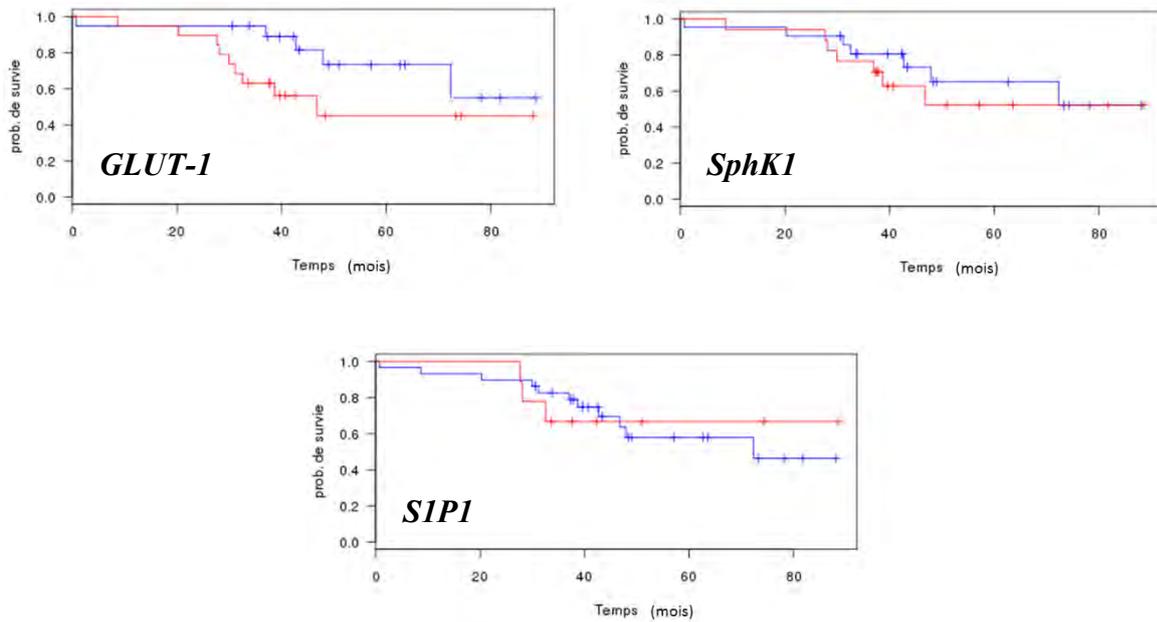


Figure 14. Survie globale dans la série OS 2006 en fonction de l'expression de GLUT-1, de la SphK1, ou de S1P1.

bleu : expression nulle à faible (IRS inférieur à la médiane) ; rouge : expression modérée à forte (IRS supérieur à la médiane).

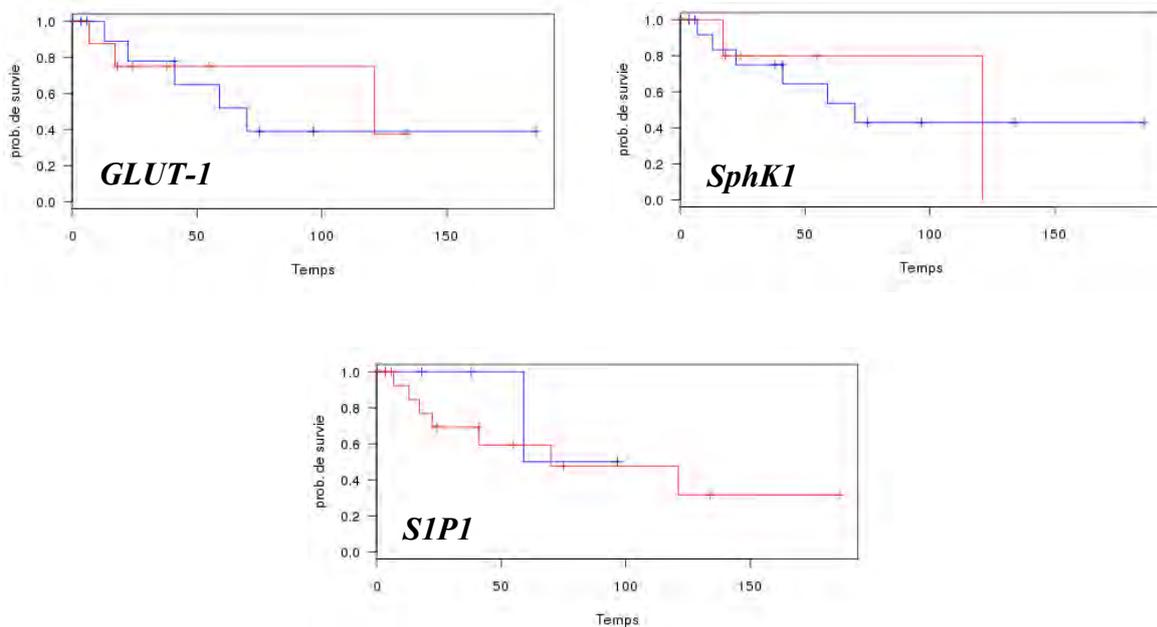


Figure 15. Survie globale dans la série OS de la mandibule en fonction de l'expression de GLUT-1, de la SphK1, ou de S1P1.

bleu : expression nulle à faible (IRS inférieur à la médiane) ; rouge : expression modérée à forte (IRS supérieur à la médiane).

4.1.6. Métastase

Nous n'avons pas retrouvé d'association entre l'expression de GLUT-1, de la SphK1 ou de S1P1 et la survenue ou non de métastase.

Tableau 11. Etude de l'expression des marqueurs évaluée selon l'IRS en fonction de la présence ou de l'absence de métastase, pour chacune des trois séries.

	Marqueurs	Non métastatique	Métastatique	<i>p</i>
OS hors 2006	GLUT-1			<i>0,92</i>
	Médiane IRS	7,5	6	
	(extrêmes)	(0-12)	(0-12)	
	SphK1			<i>0,74</i>
	Médiane IRS	6	6	
	(extrêmes)	(0-8)	(0-8)	
OS 2006	S1P1			<i>0,91</i>
	Médiane IRS	4	3	
	(extrêmes)	(2-12)	(0-12)	
	GLUT-1			<i>0,13</i>
	Médiane IRS	6	9	
	(extrêmes)	(0-12)	(0-12)	
OS 2006	SphK1			<i>0,67</i>
	Médiane IRS	6	3	
	(extrêmes)	(0-12)	(0-12)	
	S1P1			<i>0,84</i>
	Médiane IRS	3	3	
	(extrêmes)	(2-6)	(0-6)	
Mandibule	GLUT-1			<i>0,23</i>
	Médiane IRS	7,5	4	
	(extrêmes)	(0-9)	(0-6)	
	SphK1			<i>0,60</i>
	Médiane IRS	3	3	
	(extrêmes)	(0-8)	(3-3)	
Mandibule	S1P1			<i>0,85</i>
	Médiane IRS	6	6	
	(extrêmes)	(2-9)	(3-6)	

4.1.7. Dosage de l'activité enzymatique de la SphK1

L'activité enzymatique de la SphK1 a été mesurée dans 10 échantillons d'os normaux et dans 13 échantillons d'OS correspondant à la biopsie initiale. 11 échantillons d'OS provenaient de patients ayant été classés bons répondeurs et 2 de patients mauvais répondeurs.

Tableau 12. Récapitulatif du dosage de l'activité enzymatique de la SphK1 et des caractéristiques des patients.

Echantillons	S1P générée (pmol/min/mg de protéines)	Réponse à la chimiothérapie	Récidive	Etat aux dernières nouvelles
Normal 1	3,65			
Normal 2	4,06			
Normal 3	2,66			
Normal 4	1,30			
Normal 5	0,43			
Normal 6	9,56			
Normal 7	5,17			
Normal 8	4,54			
Normal 9	5,07			
Normal 10	28,19			
OS 1	1046,49	BR	non	rémission complète
OS 2	1524,41	BR	non	vivant
OS 3	68,17	BR	non	vivant
OS 4	164,29	MR	oui (L et M)	décédé
OS 5	30,03	BR	non	rémission complète
OS 6	127,54	BR	oui (L et M)	décédé
OS 7	37,99	BR	non	rémission complète
OS 8	1360,79	BR	oui (L et M)	décédé
OS 9	263,09	BR	oui (M)	vivant
OS 10	219,65	MR	non	rémission complète
OS 11	6,74	BR	non	vivant
OS 12	0,83	BR	non	vivant
OS 13	59,18	BR	non	vivant

BR : bon répondeur, MR : mauvais répondeur, L : récurrence locale, M : récurrence métastatique.

L'activité enzymatique de la SphK1 était 58,4 fois plus élevée dans les OS que dans l'os normal (IC 95% [9,07 ; 342,32]). Elle était en moyenne de 6,46 pmol/min/mg dans les échantillons d'os normaux (extrêmes : 0,43 à 28,19 pmol/min/mg). Dans les échantillons d'OS, l'activité de la SphK1 était en moyenne de 377,63 pmol/min/mg (extrêmes : 0,83 à 1542,41 pmol/min/mg).

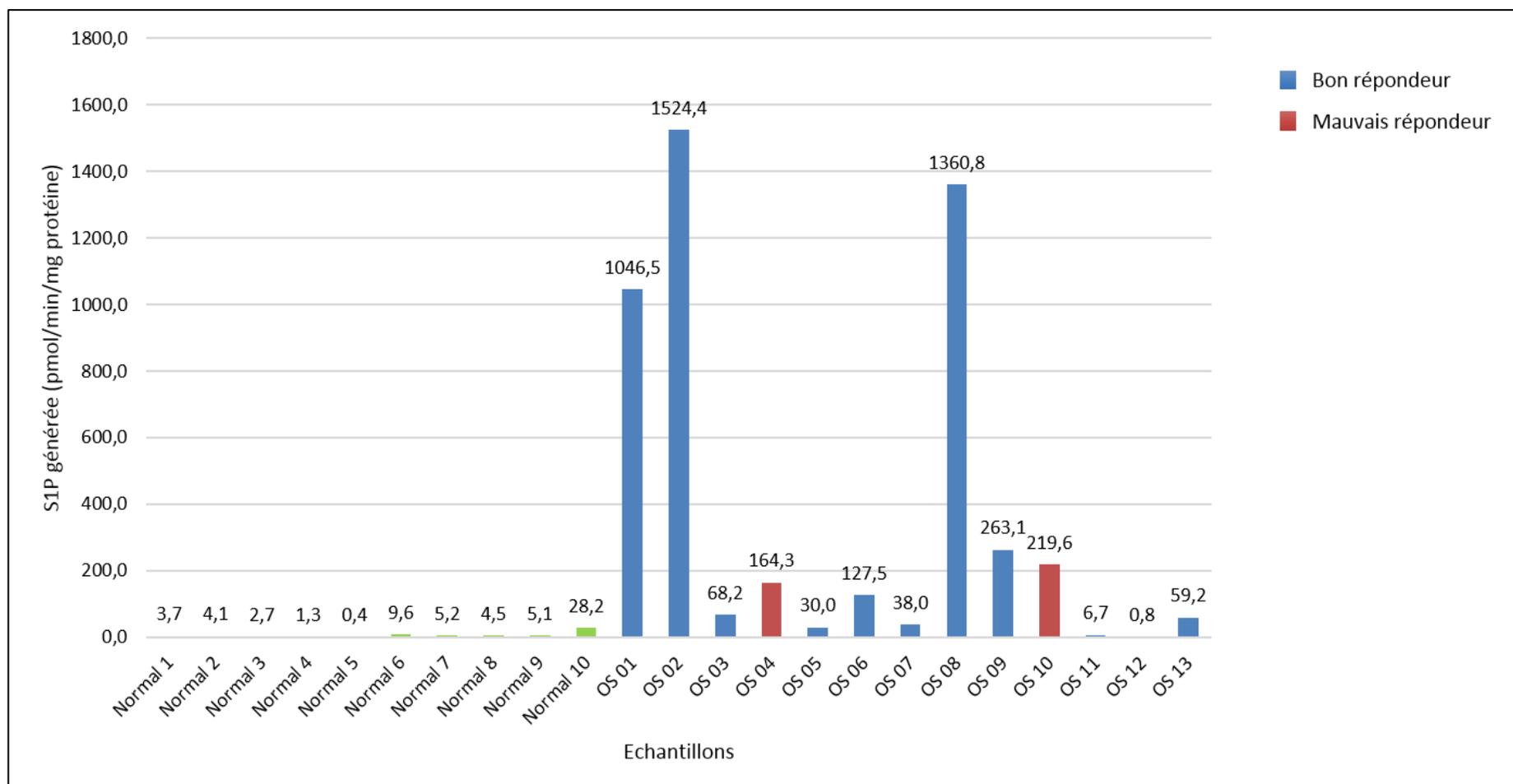


Figure 17. Dosage de l'activité enzymatique de la SphK1 dans 10 échantillons d'os normaux et 13 échantillons d'ostéosarcomes.

L'activité enzymatique de la SphK1 est exprimée en pmol de S1P générée par minute et par mg de protéines.

4.2. *In vitro*

Afin d'étayer le lien entre la SphK1 et l'hypoxie dans les OS, nous avons utilisé deux approches différentes *in vitro* dans la lignée ostéosarcomateuse humaine U-2 OS.

Nous avons tout d'abord vérifié la surexpression de HIF-1 α dans les cellules de lignée ostéosarcomateuse en hypoxie, à différents temps (Figure 18). Nous avons observé que l'expression de HIF-1 α augmentait dès 1h d'hypoxie. Elle était maximale dès 4 à 6h. Nous avons donc choisi le temps de 6h en hypoxie pour la suite de nos expériences.

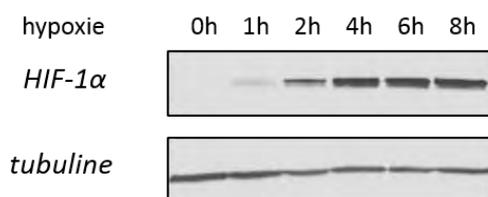


Figure 18. Cinétique de l'expression de HIF-1 α en hypoxie dans la lignée U-2 OS.

Les cellules sont placées en hypoxie (0,1% O₂) pendant une durée variant de 1h à 8h. Un contrôle en normoxie (21% O₂) a été réalisé. Le taux de la protéine HIF-1 α est analysé par Western-blot.

Nous avons ensuite testé l'effet de l'inhibition de la SphK1 sur le taux de la protéine HIF-1 α par deux approches différentes.

Nous avons tout d'abord réalisé une inhibition pharmacologique de la SphK1. Pour cela, nous avons utilisé deux molécules : le SKi et le PF-543. Nous avons observé qu'en hypoxie, l'inhibition pharmacologique de la SphK1 entraînait une diminution du taux de la protéine HIF-1 α dans la lignée d'ostéosarcome U-2 OS, avec un effet-dose (Figure 19). L'inhibition était d'environ 60% avec le SKi à 5 μ M et 80% avec le SKi à 10 μ M. La diminution du taux de HIF-1 α dans les cellules traitées par PF-543 était moins marquée, avec des diminutions de l'ordre de 20% et 40% avec les doses de 100 nM et 500 nM respectivement.

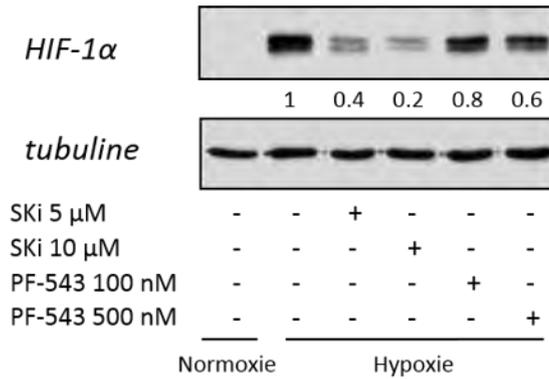


Figure 19. Effet des inhibiteurs pharmacologiques de la SphK1 sur le taux de HIF-1α en hypoxie.

Les cellules U-2 OS sont traitées par SKi, PF-543 ou DMSO 0,1% (contrôle), puis placées en hypoxie (0,1% O₂) pendant 6h. Le taux de la protéine HIF-1α est évalué par Western-blot. Les taux d'expression relatifs à la condition contrôle en hypoxie (=1) sont indiqués.

Pour confirmer ces résultats, nous avons ensuite déplété la SphK1 par une technique d'interférence à l'ARN. Nous avons observé dans les cellules U-2 OS transfectées pendant 48h avec un siRNA dirigé contre SphK1 une diminution du taux de HIF-1α en hypoxie de 80% avec la dose de 20 nM, de 60% à la dose de 50 nM et de 70% à la dose de 75 nM (Figure 20).

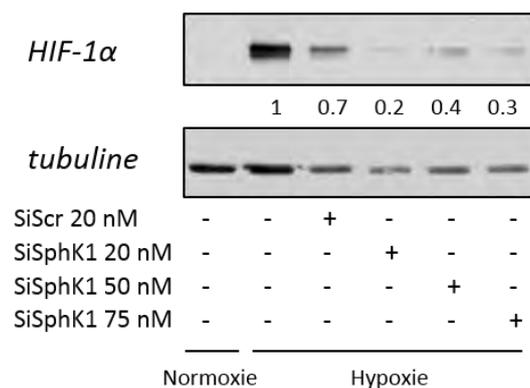


Figure 20. Effet de l'inhibition de la SphK1 par des siRNA sur le taux de HIF-1α.

Les cellules U-2 OS sont transfectées par un siRNA dirigé contre la SphK1 (siSphK1) à des concentrations de 20 nM, 50 nM ou 75 nM ou un si scramble (siScr) à 20 nM pendant 48h, puis placées en hypoxie (0,1% O₂) pendant 6h. La condition non transfectée en hypoxie constitue le contrôle, et le résultat est arbitrairement fixé à 1. Les taux d'expression relatifs à la condition non transfectée en hypoxie (=1) sont indiqués.

4.3. *In vivo*

Nous avons réalisé des immunomarquages sur une tumeur développée à partir d'une xélogreffe hétérotopique de cellules ostéosarcomateuses humaines MG-63 chez une souris *nude*.

Le marquage avec l'anticorps anti-pimonidazole soulignait la zone hypoxique périnécrotique de la tumeur. L'étude avec l'anticorps anti-SphK1 montrait un marquage cytoplasmique diminuant dans les cellules plus éloignées de la zone centrale nécrotique, constituant un gradient d'expression. Ces marquages soulignent la corrélation entre l'hypoxie et la SphK1.

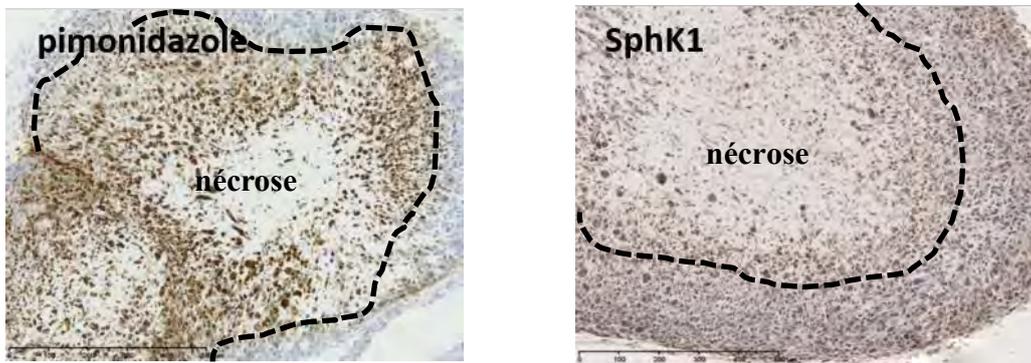


Figure 21. Corrélation entre l'hypoxie et l'expression de la SphK1 dans un modèle animal d'ostéosarcome.

A. Zone hypoxique péri-nécrotique marquée avec l'anticorps anti-pimonidazole. B. Surexpression de la SphK1 dans la zone d'hypoxie périnécrotique.

5. DISCUSSION

Le rôle de l'hypoxie dans le cancer est maintenant bien établi. L'hypoxie est responsable dans de nombreux cancers d'un phénotype plus agressif, de la survenue plus fréquente de métastase et d'une moins bonne réponse aux traitements. Dans les OS, la plupart des études associent l'hypoxie à un plus mauvais pronostic.

Par ailleurs, le rôle de la voie SphK1/S1P a également été étudié dans le cancer. Le rôle « oncogénique » de la sphingosine kinase est démontré, même s'il ne s'agit pas à proprement parler d'un oncogène.

L'implication de la voie SphK1/S1P dans l'hypoxie est récente. L'étude d'Ader et al. a montré que cette voie était impliquée dans la régulation de l'hypoxie via HIF-1 α dans plusieurs modèles de cancers tels que le cancer du poumon, du rein, du sein, de la prostate et le glioblastome.⁶⁰

Notre étude est la première à s'intéresser au rôle de la voie SphK1/S1P dans l'hypoxie intratumorale des OS.

5.1. Données cliniques

Notre étude a porté sur trois séries différentes de patients. Les données cliniques des trois séries sont en accord avec les données de la littérature.

Nous avons observé une atteinte préférentielle des adolescents et des adultes jeunes, en particulier dans les séries OS 2006 et OS hors 2006. Comme dans la littérature, il existait dans les trois séries une légère prédominance masculine. De même, la localisation prédominante était proche du genou (extrémité inférieure du fémur et extrémité supérieure du tibia).

Notre série sur les OS de la mandibule est une des plus grandes séries rapportées à ce jour. En accord avec la littérature, les OS de la mandibule dans notre série touchent des patients plus âgés que les OS non mandibulaires, avec un âge médian de 55,6 ans. De même, les métastases sont moins fréquentes, touchant 16,7 % des patients contre 38,5 à 50% dans les OS, respectivement dans la série OS 2006 et celle OS hors 2006. Le traitement des OS des os longs est extrapolé à la mandibule, sans qu'il n'existe de véritable consensus ou recommandation nationale. Le traitement chirurgical avec des marges de résection R0 est le seul traitement associé à un meilleur pronostic. La chimiothérapie néoadjuvante, comme pour

les OS situés dans les os longs, paraît être associée à une meilleure survie globale.⁵ Les patients de notre série ont été traités par chirurgie d'emblée dans 45,8% des cas. La réalisation d'une radiothérapie, pour assurer le contrôle local est controversée et n'a pas fait la preuve de son efficacité.⁵

5.2. Corrélation entre les marqueurs immunohistochimiques

Dans les échantillons tissulaires d'OS, nos résultats montrent une corrélation positive entre l'expression en immunohistochimie de GLUT-1 et celle de la SphK1. Nous avons retrouvé cette corrélation dans les trois séries étudiées, soulignant le lien entre l'hypoxie, représentée par GLUT-1, et la SphK1 dans les OS.

Nous retrouvons également une corrélation positive entre l'expression de la SphK1 et celle du récepteur S1P1, dans la série OS 2006. Ceci pourrait être en faveur d'une action de la S1P, produite par la SphK1, par un mécanisme extracellulaire via le récepteur S1P1. Cependant nous avons observé ce résultat dans une seule des trois séries.

Nous n'avons pas pu étudier l'expression de HIF-1 α en immunohistochimie en raison de difficultés techniques concernant la mise au point de l'anticorps. En effet, nous avons testé plusieurs anticorps, et nous n'avons pas pu obtenir de marquage. Outre le fait que HIF-1 α est une protéine très instable d'une durée de vie inférieure à 5 minutes, rendant la mise en évidence de sa surexpression délicate, plusieurs autres paramètres peuvent expliquer cet échec de mise au point. Le tissu osseux est un tissu qui doit être décalcifié pour être analysé sur coupe en paraffine. L'étape de décalcification, en plus de la fixation, altère les possibilités de mise en évidence de certains antigènes. De plus, les protocoles de prise en charge des biopsies ne sont pas équivalentes entre les différents centres, ce qui complexifie encore la technique de mise au point d'anticorps. L'ancienneté de certains échantillons a également pu modifier leur qualité. Il a déjà été rapporté que la détection de HIF-1 α en immunohistochimie diminuait fortement pour les prélèvements anciens.⁶⁸

In vitro, nos résultats indiquent également un lien entre l'hypoxie et la SphK1. Nous avons en effet observé que l'inhibition de la SphK1 par deux méthodes différentes, pharmacologique et par interférence à l'ARN, entraînait une diminution de l'expression de HIF-1 α .

Nous avons de plus retrouvé ce lien entre l'hypoxie et la SphK1 dans un modèle murin d'ostéosarcome : nous avons observé qu'il existait une corrélation entre le marquage des zones hypoxiques par le pimonidazole et l'expression de la SphK1.

5.3. Hypoxie et pronostic des ostéosarcomes

Réponse à la chimiothérapie

Deux études ont montré que l'expression de HIF-1 α dans les OS était associée à une mauvaise réponse à la chimiothérapie. Chen Y. et al. et Yang et al. ont montré que HIF-1 α était exprimé dans plus de la moitié des OS étudiés (39 cas et 49 cas respectivement), et que cette expression était associée à une mauvaise réponse à la chimiothérapie.^{44,69} Chen Y. et al. ont également montré que l'expression de HIF-1 α était associée à celle de VEGF.⁴⁴

Métastase

Cinq études dont celle de Chen Y. ont montré que l'expression de HIF-1 α était associée à un risque plus élevé de métastase.^{44,47,70-72} La plus importante de ces études a porté sur 107 cas d'OS de haut grade, conventionnels et non conventionnels (télangiectasiques et à petites cellules).⁴⁷ Cette étude a aussi montré la surexpression de l'ARNm de HIF-1 α dans les échantillons d'OS métastatiques par rapport aux OS non métastatiques. Dans la série de Chen W., l'hétérogénéité du grade et du sous-type histologique des 25 OS de la mandibule rapportés ne permet pas d'associer formellement HIF-1 α à un plus mauvais pronostic.⁷²

Survie globale et sans progression

Dans la littérature, l'hypoxie est le plus souvent associée à un plus mauvais pronostic. De même, la surexpression de GLUT-1, souvent utilisé comme substitut de HIF-1 α pour apprécier l'hypoxie en immunohistochimie, est associée à une diminution de la survie sans progression dans les 25 cas d'OS de la série de Kubo et al.⁷³

Cependant d'autres études n'ont pas trouvé d'association statistiquement significative avec la survie globale ou sans progression.⁶⁹

Nos résultats ne montrent pas d'impact pronostique de la surexpression de GLUT-1. Nous n'observons pas d'effet sur la réponse à la chimiothérapie, ni sur la survenue de métastase ou la survie globale ou sans progression.

Il est probable que d'autres facteurs que l'hypoxie contribuent au développement de la résistance aux traitements ou à l'acquisition d'un phénotype plus agressif. Plusieurs hypothèses sont à l'étude. Le microenvironnement, en établissant un cercle vicieux entre les cellules ostéosarcomateuses et les ostéoclastes, pourrait favoriser la résorption osseuse et activer la prolifération tumorale (via le système RANK/RANKL/Ostéoprotégérine). De même le rôle du microenvironnement immunitaire dans ce modèle cancéreux « ostéoimmunologique » pourrait induire un contrôle de la réponse immunitaire au profit du développement tumoral.

5.4. SphK1 et pronostic

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de lien entre l'expression de la SphK1 et le pronostic, que ce soit en termes de réponse à la chimiothérapie, de métastase ou de survie globale, dans aucune des trois séries de patients.

Dans la littérature, une seule étude s'est intéressée à la SphK1 dans les OS.⁶² Ces travaux avaient montré que la SphK1 était surexprimée dans les OS, par Western-blot (5 échantillons) et immunohistochimie (1 échantillon). Nos résultats confirment la surexpression de la SphK1 dans les OS, cette fois sur une large série. Seulement 12 cas sur 101 ne montraient pas d'expression de la SphK1 en immunohistochimie. L'expression de la SphK1 était modérée à forte dans plus de la moitié des cas.

Plusieurs études ont établi que la SphK1 était surexprimée dans certains cancers tels que les cancers de la prostate,⁵⁹ de l'endomètre⁷⁴ et du col utérin,⁷⁵ et que cette expression était associée à un plus mauvais pronostic.⁷⁵ Dans les OS, notre étude ne retrouve pas d'impact pronostique de la SphK1. Une des explications serait que l'augmentation de la S1P, favorable à la prolifération cellulaire et la survie, peut être la conséquence d'une surexpression de la SphK1, mais également d'une augmentation de son activité sans surexpression.

5.5. Activité enzymatique de la SphK1

Dans notre étude, nous avons en effet observé une nette augmentation de l'activité de la SphK1 dans les OS par rapport à l'os normal, avec une activité moyenne de 377,63 pmol/min/mg et 6,46 pmol/min/mg respectivement.

Nous avons observé une activité moyenne de la SphK1 plus élevée dans les OS ayant bien répondu à la chimiothérapie que chez les mauvais répondeurs. Cependant seuls deux échantillons d'OS sur 13 provenaient de patients mauvais répondeurs. De plus, la variabilité au sein des échantillons provenant de patients bons répondeurs était importante. Ces données ne nous permettent donc pas de corréler l'activité de la SphK1 à la réponse à la chimiothérapie.

Il serait intéressant de doser l'activité de la SphK1 dans un plus grand nombre d'échantillons provenant de mauvais répondeurs, afin de vérifier si l'on retrouve une activité modérée de la SphK1, inférieure à celle des bons répondeurs. Ceci pourrait suggérer un rôle favorable de la SphK1 dans la réponse à la chimiothérapie. Si l'on observe au contraire une grande variabilité de l'activité de la SphK1, à l'instar des patients bons répondeurs, cela serait plus en faveur d'une hétérogénéité des OS, peut-être liée à la complexité du génome des OS.

5.6. Perspectives

L'extrême hétérogénéité structurale des OS et la faible fréquence des mutations récurrentes rend difficile le développement de thérapies ciblées. Le développement de stratégies thérapeutiques ciblant le microenvironnement peut dans certains types de tumeurs avoir un effet favorable, ce qui renforce l'idée de traiter les patients selon une approche personnalisée.

Ainsi, malgré l'absence de corrélation évidente entre la SphK1 et le pronostic, nos résultats soulignent l'intérêt potentiel du ciblage de la voie SphK1/S1P dans les OS. Il serait intéressant d'étudier, d'abord *in vitro* puis sur des modèles animaux d'OS, l'effet de l'inhibition du produit de la SphK1, la S1P. Cette stratégie d'inhibition de la voie SphK1/S1P pourrait notamment se faire par le SphingomabTM, un anticorps monoclonal qui fait l'objet d'essais cliniques de phase I et II dans le carcinome rénal à cellules claires. Une autre stratégie d'inhibition de la voie de signalisation par le FTY720 pourrait aussi être une approche thérapeutique intéressante, via les récepteurs de la S1P.

CONCLUSION

Notre étude est la première à s'intéresser au rôle de la voie SphK1/S1P dans l'hypoxie intratumorale des ostéosarcomes. Elle a été réalisée sur trois séries de patients, soit 101 patients au total, représentant une des plus grandes séries décrites à ce jour.

Nos travaux ont mis en évidence un lien entre l'hypoxie (GLUT-1, pimonidazole) et la SphK1 dans les ostéosarcomes de haut grade. Ce lien a été retrouvé à la fois chez les patients, par étude immunohistochimique, et *in vitro* dans une lignée ostéosarcomateuse. Nous avons également montré que l'activité de la SphK1 était augmentée de façon significative dans les ostéosarcomes par rapport à l'os normal.

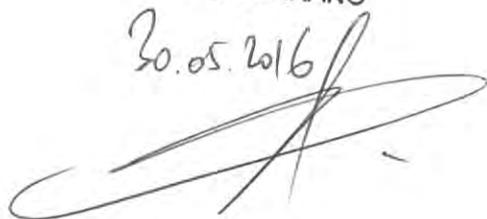
Nous n'avons toutefois pas pu mettre en évidence d'impact pronostique de GLUT-1, de la SphK1 ou du récepteur S1P1 dans les ostéosarcomes. Nous n'avons en effet pas retrouvé de corrélation significative entre l'expression de ces marqueurs d'une part, et la réponse à la chimiothérapie, la survenue de métastase ou la survie globale ou sans progression d'autre part. L'absence de corrélation évidente entre la SphK1 et le pronostic indique que d'autres facteurs sont vraisemblablement impliqués dans la résistance au traitement et la survenue de métastase (facteurs du microenvironnement immunitaire et du remodelage osseux).

L'extrême hétérogénéité génomique des ostéosarcomes rend difficile le développement de thérapies ciblées. Cependant, nos résultats soulignent que, chez certains patients, le ciblage de la voie SphK1/S1P pourrait avoir un intérêt. De nouvelles études expérimentales avec des traitements inhibiteurs de la voie SphK1/S1P devront être réalisées sur des modèles animaux afin de mieux comprendre les relations entre l'hypoxie et la voie SphK1/S1P, et vérifier leur intérêt potentiel dans le traitement des ostéosarcomes.

Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
De Médecine Rangueil

E. SERRANO

30.05.2016



Professeur Emmanuelle URO-COSTE
Département d'Anatomie et Cytologie Pathologiques
INSTITUT UNIVERSITAIRE DU CANCER
1 avenue Irène Joliot-Curie
31059 TOULOUSE CEDEX 9
Tél. 05 31 15 62 02

25/5/2016

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Group, T. E. S. N. W. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 25, iii113–iii123 (2014).
2. Kansara, M., Teng, M. W., Smyth, M. J. & Thomas, D. M. Translational biology of osteosarcoma. *Nat. Rev. Cancer* 14, 722–735 (2014).
3. Ducimetière, F. et al. Incidence, épidémiologie des sarcomes et biologie moléculaire. Résultats préliminaires de l'étude EMS en Rhône-Alpes. *Bull. Cancer (Paris)* 97, 629–641 (2010).
4. Savage, S. A. & Mirabello, L. Using Epidemiology and Genomics to Understand Osteosarcoma Etiology. *Sarcoma* 2011, 1–13 (2011).
5. Thariat, J. et al. Osteosarcomas of the mandible: Are they different from other tumor sites? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 82, 280–295 (2012).
6. WHO classification of tumours of soft tissue and bone. (IARC Press, 2013).
7. Davis, J. L. & Horvai, A. E. SATB2 expression is sensitive but may not be specific for osteosarcoma compared to other high-grade primary bone sarcomas. *Histopathology* (2015). doi:10.1111/his.12911
8. Mirabello, L. et al. Height at diagnosis and birth-weight as risk factors for osteosarcoma. *Cancer Causes Control* 22, 899–908 (2011).
9. Hansen, M. F., Seton, M. & Merchant, A. Osteosarcoma in Paget's Disease of Bone. *J. Bone Miner. Res.* 21, P58–P63 (2006).
10. Wiklund, T. A. et al. Postirradiation sarcoma. Analysis of a nationwide cancer registry material. *Cancer* 68, 524–531 (1991).
11. Ognjanovic, S., Olivier, M., Bergemann, T. L. & Hainaut, P. Sarcomas in TP53 germline mutation carriers: A review of the IARC TP53 database. *Cancer* 118, 1387–1396 (2012).
12. Kleinerman, R. A., Schonfeld, S. J. & Tucker, M. A. Sarcomas in hereditary retinoblastoma. *Clin. Sarcoma Res.* 2, 1 (2012).
13. Calvert, G. T. et al. At-Risk Populations for Osteosarcoma: The Syndromes and Beyond. *Sarcoma* 2012, 1–9 (2012).
14. Chen, X. et al. Recurrent Somatic Structural Variations Contribute to Tumorigenesis in Pediatric Osteosarcoma. *Cell Rep.* 7, 104–112 (2014).
15. Bousquet, M. et al. Whole exome sequencing in osteosarcoma reveals important heterogeneity of genetic alterations. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* (2016). doi:10.1093/annonc/mdw009
16. Kresse, S. H. et al. LSAMP, a novel candidate tumor suppressor gene in human osteosarcomas, identified by array comparative genomic hybridization. *Genes. Chromosomes Cancer* 48, 679–693 (2009).

17. Squire, J. A. et al. High-resolution mapping of amplifications and deletions in pediatric osteosarcoma by use of CGH analysis of cDNA microarrays. *Genes. Chromosomes Cancer* 38, 215–225 (2003).
18. Stephens, P. J. et al. Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell* 144, 27–40 (2011).
19. Marcove, R. C., Miké, V., Hajek, J. V., Levin, A. G. & Hutter, R. V. Osteogenic sarcoma under the age of twenty-one. A review of one hundred and forty-five operative cases. *J. Bone Joint Surg. Am.* 52, 411–423 (1970).
20. Anderson, M. E. Update on Survival in Osteosarcoma. *Orthop. Clin. North Am.* 47, 283–292 (2016).
21. Meyers, P. A. et al. Chemotherapy for nonmetastatic osteogenic sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 10, 5–15 (1992).
22. Rosen, G. et al. Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. *Cancer* 49, 1221–1230 (1982).
23. Ando, K. et al. Current Therapeutic Strategies and Novel Approaches in Osteosarcoma. *Cancers* 5, 591–616 (2013).
24. Shaikh, A. B. et al. Present Advances and Future Perspectives of Molecular Targeted Therapy for Osteosarcoma. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 506 (2016).
25. Meyers, P. A. et al. Osteosarcoma: The Addition of Muramyl Tripeptide to Chemotherapy Improves Overall Survival--A Report From the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 26, 633–638 (2008).
26. Harris, M. B. et al. Treatment of metastatic osteosarcoma at diagnosis: a Pediatric Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 16, 3641–3648 (1998).
27. Iyer, N. V. et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 12, 149–162 (1998).
28. Yoon, D. et al. Hypoxia-inducible factor-1 deficiency results in dysregulated erythropoiesis signaling and iron homeostasis in mouse development. *J. Biol. Chem.* 281, 25703–25711 (2006).
29. Harris, A. L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* 2, 38–47 (2002).
30. Ader, I. & Cuvillier, O. La sphingosine 1-phosphate dans la régulation de l'hypoxie intratumorale. *Regard Sur Biochim.* 6–8 (2010).
31. Vaupel, P. & Mayer, A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 225–239 (2007).

32. Vaupel, P., Thews, O. & Hoeckel, M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 18, 243–259 (2001).
33. Bos, R. et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 97, 1573–1581 (2003).
34. Nordsmark, M. et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 77, 18–24 (2005).
35. Nordsmark, M. et al. The prognostic value of pimonidazole and tumour pO₂ in human cervix carcinomas after radiation therapy: a prospective international multi-center study. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 80, 123–131 (2006).
36. Knocke, T. H., Weitmann, H. D., Feldmann, H. J., Selzer, E. & Pötter, R. Intratumoral pO₂-measurements as predictive assay in the treatment of carcinoma of the uterine cervix. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 53, 99–104 (1999).
37. Hoskin, P. J., Sibtain, A., Daley, F. M. & Wilson, G. D. GLUT1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in bladder cancer: relationship with vascularity and proliferation as predictors of outcome of ARCON. *Br. J. Cancer* 89, 1290–1297 (2003).
38. Toi, M., Matsumoto, T. & Bando, H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol.* 2, 667–673 (2001).
39. Erler, J. T. & Giaccia, A. J. Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer Res.* 66, 10238–10241 (2006).
40. Koukourakis, M. I. et al. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br. J. Cancer* 89, 877–885 (2003).
41. Jain, R. K. Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science* 307, 58–62 (2005).
42. Gottesman, M. M., Fojo, T. & Bates, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* 2, 48–58 (2002).
43. Cuvillier, O. et al. Hypoxia, Therapeutic Resistance, and Sphingosine 1-Phosphate. Role Sphingolipids *Cancer Dev. Ther.* 117 (2012).
44. Chen, Y., Yang, Y., Yuan, Z., Wang, C. & Shi, Y. Predicting chemosensitivity in osteosarcoma prior to chemotherapy: An investigational study of biomarkers with immunohistochemistry. *Oncol. Lett.* 3, 1011–1016 (2012).
45. Le Guellec, S. et al. The β 5/focal adhesion kinase/glycogen synthase kinase 3 β integrin pathway in high-grade osteosarcoma: a protein expression profile predictive of response to neoadjuvant chemotherapy. *Hum. Pathol.* 44, 2149–2158 (2013).
46. Roncuzzi, L., Pancotti, F. & Baldini, N. Involvement of HIF-1 α activation in the doxorubicin resistance of human osteosarcoma cells. *Oncol. Rep.* 32, 389–394 (2014).

47. Guan, G. et al. The HIF-1 α /CXCR4 pathway supports hypoxia-induced metastasis of human osteosarcoma cells. *Cancer Lett.* 357, 254–264 (2015).
48. Spiegel, S. & Milstien, S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 397–407 (2003).
49. Pitson, S. M. et al. Human sphingosine kinase: purification, molecular cloning and characterization of the native and recombinant enzymes. *Biochem. J.* 350 Pt 2, 429–441 (2000).
50. Pitson, S. M. et al. Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. *EMBO J.* 22, 5491–5500 (2003).
51. Pyne, S. & Pyne, N. J. Translational aspects of sphingosine 1-phosphate biology. *Trends Mol. Med.* 17, 463–472 (2011).
52. Cuvillier, O. et al. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381, 800–803 (1996).
53. Olivera, A. et al. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J. Cell Biol.* 147, 545–558 (1999).
54. Hait, N. C. et al. Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* 325, 1254–1257 (2009).
55. Pyne, N. J. & Pyne, S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 489–503 (2010).
56. Spiegel, S. & Milstien, S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 403–415 (2011).
57. Xia, P. et al. An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr. Biol.* 10, 1527–1530 (2000).
58. Cuvillier, O. Downregulating sphingosine kinase-1 for cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 12, 1009–1020 (2008).
59. Malavaud, B. et al. Sphingosine kinase-1 activity and expression in human prostate cancer resection specimens. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 46, 3417–3424 (2010).
60. Ader, I., Brizuela, L., Bouquerel, P., Malavaud, B. & Cuvillier, O. Sphingosine kinase 1: a new modulator of hypoxia inducible factor 1 α during hypoxia in human cancer cells. *Cancer Res.* 68, 8635–8642 (2008).
61. Ader, I., Malavaud, B. & Cuvillier, O. When the Sphingosine Kinase 1/Sphingosine 1-Phosphate Pathway Meets Hypoxia Signaling: New Targets for Cancer Therapy. *Cancer Res.* 69, 3723–3726 (2009).
62. Yao, C. et al. Co-administration phenoxodiol with doxorubicin synergistically inhibit the activity of sphingosine kinase-1 (SphK1), a potential oncogene of osteosarcoma, to suppress osteosarcoma cell growth both in vivo and in vitro. *Mol. Oncol.* 6, 392–404 (2012).

63. Pchejetski, D. et al. FTY720 (fingolimod) sensitizes prostate cancer cells to radiotherapy by inhibition of sphingosine kinase-1. *Cancer Res.* 70, 8651–8661 (2010).
64. Visentin, B. et al. Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell* 9, 225–238 (2006).
65. Guérin, M. et al. A new subtype of high-grade mandibular osteosarcoma with RASAL1/MDM2 amplification. *Hum. Pathol.* 50, 70–78 (2016).
66. French, K. J. et al. Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res.* 63, 5962–5969 (2003).
67. Schnute, M. E. et al. Modulation of cellular S1P levels with a novel, potent and specific inhibitor of sphingosine kinase-1. *Biochem. J.* 444, 79–88 (2012).
68. Biswas, S. et al. CD31 angiogenesis and combined expression of HIF-1 α and HIF-2 α are prognostic in primary clear-cell renal cell carcinoma (CC-RCC), but HIF α transcriptional products are not: implications for antiangiogenic trials and HIF α biomarker studies in primary CC-RCC. *Carcinogenesis* 33, 1717–1725 (2012).
69. Yang, Q.-C. et al. Overexpression of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Human Osteosarcoma: Correlation with Clinicopathological Parameters and Survival Outcome. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 37, 127–134 (2007).
70. Guo, M. et al. Hypoxia promotes migration and induces CXCR4 expression via HIF-1 α activation in human osteosarcoma. *PloS One* 9, e90518 (2014).
71. Mizobuchi, H., García-Castellano, J. M., Philip, S., Healey, J. H. & Gorlick, R. Hypoxia Markers in Human Osteosarcoma: An Exploratory Study. *Clin. Orthop.* 466, 2052–2059 (2008).
72. Chen, W., Feng, H. & Li, H. Expression and significance of hypoxemia-inducible factor-1 α in osteosarcoma of the jaws. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 106, 254–257 (2008).
73. Kubo, T. et al. Does expression of glucose transporter protein-1 relate to prognosis and angiogenesis in osteosarcoma? *Clin. Orthop.* 473, 305–310 (2015).
74. Knapp, P. et al. Altered sphingolipid metabolism in human endometrial cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 92, 62–66 (2010).
75. Kim, H.-S. et al. Sphingosine kinase 1 is a reliable prognostic factor and a novel therapeutic target for uterine cervical cancer. *Oncotarget* 6, 26746–26756 (2015).

IMPLICATION DE LA VOIE SPHINGOSINE KINASE 1 / SPHINGOSINE 1-PHOSPHATE DANS L'HYPOXIE INTRATUMORALE DES OSTEOSARCOMES

RESUME :

Objectif de l'étude : L'hypoxie est un trait caractéristique des tumeurs malignes solides, y compris les ostéosarcomes. Elle est associée à un phénotype plus agressif et à la résistance aux traitements. Des travaux ont montré que la sphingosine kinase 1 (SphK1) régulait HIF-1 α dans différents modèles de cancer. Notre objectif était de déterminer si la voie SphK1/sphingosine 1-phosphate (S1P) était impliquée dans la régulation de l'hypoxie des ostéosarcomes et d'évaluer son impact pronostique.

Matériels et méthodes : L'expression de GLUT-1, marqueur clé de l'hypoxie, de la SphK1 et du récepteur S1P1 a été évaluée par immunohistochimie dans des ostéosarcomes de la mandibule (24 cas) et des os longs (77 cas). Elle a été corrélée à la réponse à la chimiothérapie, à l'apparition de métastase et à la survie. L'activité de la SphK1 a été mesurée dans des échantillons d'ostéosarcomes humains (13 cas) et d'os normal.

Résultats : L'expression de GLUT-1 en immunohistochimie était corrélée à celle de la SphK1 dans les ostéosarcomes ($r_s=0,35$ à $0,50$, $p<0,05$). Il n'y avait pas de corrélation avec l'expression de S1P1. Aucune corrélation n'a été retrouvée entre, d'une part l'expression des différents marqueurs, et d'autre par la réponse à la chimiothérapie, l'apparition de métastase ou la survie. L'activité kinase de la SphK1 était 58,43 fois plus élevée dans les ostéosarcomes que dans l'os normal (IC 95% [9,07 ; 342,32]).

Conclusion : La voie SphK1/S1P est impliquée dans la régulation de l'hypoxie des ostéosarcomes. L'absence de corrélation entre l'activation de cette voie et le pronostic souligne la difficulté du développement de thérapies ciblées dans ces sarcomes à génomique complexe.

TITRE EN ANGLAIS : Role of sphingosine kinase 1 / sphingosine 1-phosphate pathway in intra tumoral hypoxia of osteosarcomas

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée clinique

MOTS-CLÉS : ostéosarcome, hypoxie, sphingosine kinase 1, pronostic.

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Toulouse III-Paul Sabatier
Faculté de médecine Toulouse-Purpan,
37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse

Directrice de thèse : Pr Anne GOMEZ-BROUCHET