

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTÉS DE MÉDECINE

ANNÉE 2021

2021 TOU3 1652

THÈSE

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

Présentée et soutenue publiquement

par

Guillaume CASES

le 29 septembre 2021

ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION SPATIALE DU MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE DANS LES OSTEOSARCOMES ET CORRELATIONS AUX DONNEES DE L'IMAGERIE

Directeur de thèse : Pr Anne GOMEZ-BROUCHET

JURY

Monsieur le Professeur	Pierre BROUSSET	Président
Madame le Professeur	Anne GOMEZ-BROUCHET	Assesseur
Madame le Professeur	Marie FARUCH	Assesseur
Madame le Docteur	Pauline ASSEMAT	Assesseur
Monsieur le Docteur	Camille FRANCHET	Suppléant

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTÉS DE MÉDECINE

ANNÉE 2021

2021 TOU3 1652

THÈSE

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

Présentée et soutenue publiquement

par

Guillaume CASES

le 29 septembre 2021

ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION SPATIALE DU MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE DANS LES OSTEOSARCOMES ET CORRELATIONS AUX DONNEES DE L'IMAGERIE

Directeur de thèse : Pr Anne GOMEZ-BROUCHET

JURY

Monsieur le Professeur	Pierre BROUSSET	Président
Madame le Professeur	Anne GOMEZ-BROUCHET	Assesseur
Madame le Professeur	Marie FARUCH	Assesseur
Madame le Docteur	Pauline ASSEMAT	Assesseur
Monsieur le Docteur	Camille FRANCHET	Suppléant

UNIVERSITÉ PAUL SABATIER
FACULTÉ DE MÉDECINE TOULOUSE-PURPAN

Serment d'Hippocrate

*Sur ma conscience, en présence de mes maîtres et de mes condisciples,
je jure d'exercer la médecine suivant les lois de la morale,
de l'honneur et de la probité.
Je pratiquerai scrupuleusement tous mes devoirs envers les malades,
mes confrères et la société.*

TABLEAU du PERSONNEL HOSPITALO-UNIVERSITAIRE
des Facultés de Médecine de l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
au 1^{er} septembre 2020

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. CHAP Hugues	Professeur Honoraire	M. FRAYSSE Bernard
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur Honoraire	M. FREXINOS Jacques
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Yves	Professeur Honoraire	Mme GENESTAL Michèle
Doyen Honoraire	M. PUEL Pierre	Professeur Honoraire	M. GERAUD Gilles
Doyen Honoraire	M. ROUGE Daniel	Professeur Honoraire	M. GHISOLFI Jacques
Doyen Honoraire	M. VINEL Jean-Pierre	Professeur Honoraire	M. GLOCK Yves
Professeur Honoraire	M. ABBAL Michel	Professeur Honoraire	M. GOUZI Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. ADER Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. HOFF Jean
Professeur Honoraire	M. ADOUE Daniel	Professeur Honoraire	M. JOFFRE Francis
Professeur Honoraire	M. ARBUS Louis	Professeur Honoraire	M. LACOMME Yves
Professeur Honoraire	M. ARLET Jacques	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE Jacques
Professeur Honoraire	M. ARLET Philippe	Professeur Honoraire	M. LANG Thierry
Professeur Honoraire	M. ARLET-SUAU Elisabeth	Professeur Honoraire	Mme LARENG Marie-Blanche
Professeur Honoraire	M. ARNE Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. LAURENT Guy
Professeur Honoraire	M. BARRET André	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES Franck
Professeur Honoraire	M. BARTHE Philippe	Professeur Honoraire	M. LÉOPHONTE Paul
Professeur Honoraire	M. BAYARD Francis	Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL Jean-François
Professeur Honoraire	M. BOCCALON Henri	Professeur Honoraire	M. MANELFE Claude
Professeur Honoraire	M. BONAFÉ Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. MANSAT Michel
Professeur Honoraire	M. BONEU Bernard	Professeur Honoraire	M. MASSIP Patrice
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE Jean-Paul	Professeur Honoraire	Mme MARTY Nicole
Professeur Honoraire	M. BOUTAULT Franck	Professeur Honoraire	M. MAZIERES Bernard
Professeur Honoraire	M. BUGAT Roland	Professeur Honoraire	M. MONROZIES Xavier
Professeur Honoraire	M. CAHUZAC Jean-Philippe	Professeur Honoraire	M. MOSCOVICI Jacques
Professeur Honoraire	M. CARATERO Claude	Professeur Honoraire	M. MURAT
Professeur Honoraire	M. CARLES Pierre	Professeur Honoraire	M. OLIVES Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. CARRIERE Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. PASCAL Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. CARTON Michel	Professeur Honoraire	M. PESSEY Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. CATHALA Bernard	Professeur Honoraire	M. PLANTE Pierre
Professeur Honoraire	M. CHABANON Gérard	Professeur Honoraire	M. PONTONNIER Georges
Professeur Honoraire	M. CHAMONTIN Bernard	Professeur Honoraire	M. POURRAT Jacques
Professeur Honoraire	M. CHAVOIN Jean-Pierre	Professeur Honoraire	M. PRADERE Bernard
Professeur Honoraire	M. CLANET Michel	Professeur Honoraire	M. PRIS Jacques
Professeur Honoraire	M. CONTE Jean	Professeur Honoraire	Mme PUEL Jacqueline
Professeur Honoraire	M. COSTAGLIOLA Michel	Professeur Honoraire	M. PUJOL Michel
Professeur Honoraire	M. COTONAT Jean	Professeur Honoraire	M. QUERLEU Denis
Professeur Honoraire	M. DABERNAT Henri	Professeur Honoraire	M. RAILHAC Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. DAHAN Marcel	Professeur Honoraire	M. REGIS Henri
Professeur Honoraire	M. DALOUS Antoine	Professeur Honoraire	M. REGNIER Claude
Professeur Honoraire	M. DALY-SCHVEITZER Nicolas	Professeur Honoraire	M. REME Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. DAVID Jean-Frédéric	Professeur Honoraire	M. ROCHE Henri
Professeur Honoraire	M. DELSOL Georges	Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI Pierre
Professeur Honoraire	Mme DELISLE Marie-Bernadette	Professeur Honoraire	M. ROLLAND Michel
Professeur Honoraire	Mme DIDIER Jacqueline	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE Christian
Professeur Honoraire	M. DUCOS Jean	Professeur Honoraire	M. RUMEAU Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. DUFFAUT Michel	Professeur Honoraire	M. SALVADOR Michel
Professeur Honoraire	M. DUPRE M.	Professeur Honoraire	M. SALVAYRE Robert
Professeur Honoraire	M. DURAND Dominique	Professeur Honoraire	M. SARRAMON Jean-Pierre
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU Guy	Professeur Honoraire	M. SIMON Jacques
Professeur Honoraire	M. ESCANDE Michel	Professeur Honoraire	M. SUC Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE Henri	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. ESCOURROU Jean	Professeur Honoraire	M. TKACZUK Jean
Professeur Honoraire	M. ESQUERRE J.P.	Professeur Honoraire	M. TREMOULET Michel
Professeur Honoraire	M. FABIÉ Michel	Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE Pierre
Professeur Honoraire	M. FABRE Jean	Professeur Honoraire	M. VAYSSE Philippe
Professeur Honoraire	M. FOURNIAL Gérard	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE Christian
Professeur Honoraire	M. FOURNIE Bernard	Professeur Honoraire	M. VOIGT Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. FORTANIER Gilles		

Professeurs Émérites

Professeur ADER Jean-Louis	Professeur LAGARRIGUE Jacques
Professeur ALBAREDE Jean-Louis	Professeur LANG Thierry
Professeur ARBUS Louis	Professeur LARENG Louis
Professeur ARLET-SUAU Elisabeth	Professeur LAURENT Guy
Professeur BOCCALON Henri	Professeur LAZORTHES Yves
Professeur BONEU Bernard	Professeur MAGNAVAL Jean-François
Professeur CARATERO Claude	Professeur MANELFE Claude
Professeur CHAMONTIN Bernard	Professeur MASSIP Patrice
Professeur CHAP Hugues	Professeur MAZIERES Bernard
Professeur CONTE Jean	Professeur MOSCOVICI Jacques
Professeur COSTAGLIOLA Michel	Professeur RISCHMANN Pascal
Professeur DABERNAT Henri	Professeur RIVIERE Daniel
Professeur FRAYSSE Bernard	Professeur ROQUES-LATRILLE Christian
Professeur DELISLE Marie-Bernadette	Professeur SALVAYRE Robert
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur SARRAMON Jean-Pierre
Professeur JOFFRE Francis	Professeur SIMON Jacques

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex

P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1^{ère} classe

Doyen : Elie SERRANO

P.U. - P.H.

2^{ème} classe

M. ARBUS Christophe	Psychiatrie
M. ACAR Philippe	Pédiatrie
M. ACCADBLED Franck	Chirurgie Infantile
M. ALRIC Laurent (C.E)	Médecine Interne
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie
M. ARNAL Jean-François	Physiologie
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique
M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie
M. BUJAN Louis (C. E)	Urologie-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire
M. BUSCAIL Louis (C.E)	Hépatogastro-Entérologie
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie
M. CARON Philippe (C.E)	Endocrinologie
M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire
M. CHAYNES Patrick	Anatomie
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie
M. COURBON Frédéric	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologique
M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DELABESSE Eric	Hématologie
M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses
M. DELORD Jean-Pierre	Cancérologie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie
Mme DÜLY-BOUHANICK Béatrice (C.E)	Thérapeutique
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie
M. GALINIER Michel (C.E)	Cardiologie
M. GLOCK Yves (C.E)	Chirurgie Cardio-Vasculaire
Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie
M. GRAND Alain (C.E)	Epidémiologie. Eco. de la Santé et Prév.
M. GROLEAU RAOUX Jean-Louis (C.E)	Chirurgie plastique
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie
Mme HANAIRE Hélène (C.E)	Endocrinologie
M. HUYGHE Eric	Urologie
M. KAMAR Nassim (C.E)	Néphrologie
M. LARRUE Vincent	Neurologie
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie
M. MALECAZE François (C.E)	Ophthalmologie
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation
M. MAURY Jean-Philippe	Cardiologie
Mme MAZEREEUW Juliette	Dermatologie
M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation
M. OTAL Philippe	Radiologie
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile
M. RITZ Patrick (C.E)	Nutrition
M. ROLLAND Yves (C.E)	Gériatrie
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie
M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie
M. SAILLER Laurent	Médecine Interne
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD Jean-Michel (C.E)	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
Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique
M. VAYSSIERE Christophe	Gynécologie Obstétrique
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie

M. ABBO Olivier	Chirurgie infantile
M. AUSSEIL Jérôme	Biochimie et biologie moléculaire
M. BERRY Antoine	Parasitologie
M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
Mme BOURNET Barbara	Gastro-entérologie
M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
Mme DALENC Florence	Cancérologie
M. DE BONNECAZE Guillaume	Anatomie
M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
Mme FARUCH-BILFELD Marie	Radiologie et Imagerie Médicale
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie
M. FRANCHITTO Nicolas	Addictologie
Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. GARRIDO-STÖWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
M. GATIMEL Nicolas	Médecine de la reproduction
M. GUILLEMINAULT Laurent	Pneumologie
Mme LAPRIE Anne	Radiothérapie
M. LAURENT Camille	Anatomie Pathologique
M. LE CAIGNEC Cédric	Génétique
M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
M. PUGNET Grégory	Médecine interne, Gériatrie
M. REINA Nicolas	Chirurgie orthopédique et traumatologique
M. RENAUDINEAU Yves	Immunologie
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation
M. SOLER Vincent	Ophthalmologie
Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugénia	Gériatrie et biologie du vieillissement
M. TACK Ivan	Physiologie
M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. YSEBAERT Loic	Hématologie

P.U. Médecine générale

Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve

Professeur Associé de Médecine

M. BOYER Pierre

M. STILLMUNKES André

M.C.U. - P.H.

M. APOIL Pol Andre	Immunologie
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie
Mme AUSSEIL-TRUDEL Stéphanie	Biochimie et Biologie Moléculaire
Mme BELLIERE-FABRE Julie	Néphrologie
Mme BERTOLI Sarah	Hématologie, transfusion
M. BIETH Eric	Génétique
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition
Mme CASSAGNE Myriam	Ophthalmologie
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie
Mme CHANTALAT Elodie	Anatomie
M. CONGY Nicolas	Immunologie
Mme COURBON Christine	Pharmacologie
M. CUROT Jonathan	Neurologie
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie
M. GANTET Pierre	Biophysique
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire
M. HAMDJ Safouane	Biochimie
Mme HITZEL Anne	Biophysique
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie
M. LHOMME Sébastien	Bactériologie-virologie
Mme MASSIP Clémence	Bactériologie-virologie
Mme MONTASTIER-SIMMERMAN Emilie	Nutrition
Mme MOREAU Marion	Physiologie
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire
Mme PERROT Aurore	Hématologie ; Transfusion
M. PILLARD Fabien	Physiologie
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY Frédérique	Biochimie
Mme SAÛNE Karine	Bactériologie Virologie
M. TAFANI Jean-André	Biophysique
M. TREINER Emmanuel	Immunologie
M. VIDAL Fabien	Gynécologie obstétrique
Mme VIJA Lavinia	Biophysique et médecine nucléaire

M.C.U. Médecine générale

M. BRILLAC Thierry
Mme DUPOUY Julie

M.C.U. - P.H

Mme ABRAVANEL-LEGRAND Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme BASSET Céline	Cytologie et histologie
Mme BREHIN Camille	Pédiatrie
Mme CAMARE Caroline	Biochimie et biologie moléculaire
M. CAMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
Mme CAUSSE Elizabeth	Biochimie
M. CHASSAING Nicolas	Génétique
M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme COLOMBAT Magali	Anatomie et cytologie pathologiques
Mme CORRE Jill	Hématologie
M. DEDOUIT Fabrice	Médecine Légale
M. DEGBOE Yannick	Rhumatologie
M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme FLOCH Pauline	Bactériologie-Virologie; Hygiène Hospit.
Mme GALINIER Anne	Nutrition
Mme GALLINI Adeline	Epidémiologie
M. GASQ David	Physiologie
M. GATIMEL Nicolas	Médecine de la reproduction
Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
M. GUERBY Paul	Gynécologie-Obstétrique
M. GUIBERT Nicolas	Pneumologie ; Addictologie
Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LEPAGE Benoit	Biochimie
Mme MAUPAS SCHWALM Françoise	Biochimie
M. MIEUSSET Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. MOULIS Guillaume	Médecine interne
Mme NASR Nathalie	Neurologie
Mme QUELVEN Isabelle	Biophysique et Médecine Nucléaire
M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme SIEGFRIED Aurore	Anatomie et Cytologie Pathologiques
Mme VALLET-GAREL Marion	Physiologie
M. VERGEZ François	Hématologie
M. YRONDI Antoine	Psychiatrie d'Adultes ; Addictologie

M.C.U. Médecine générale

M. BISMUTH Michel
M. ESCOURROU Emile

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr CHICOULAA Bruno
Dr FREYENS Anne
Dr PUECH Marielle

Dr BIREBENT Jordan
Dr BOURGEOIS Odile
Dr LATROUS Leila
Dr. BOUSSIER Nathalie

REMERCIEMENTS

Au Président du jury,

Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse.

J'ai pris beaucoup de plaisir ces cinq dernières années à apprendre mon futur métier dans votre service. Ce travail est l'occasion de vous exprimer ma reconnaissance pour vos enseignements, votre expérience, et votre grande pédagogie. Soyez assuré du profond respect que je vous porte.

À ma directrice de thèse,

Madame le Professeur Anne GOMEZ-BROUCHET,

Je te remercie de m'avoir fait confiance en me proposant ce travail de thèse, et de m'avoir aidé à le réaliser. J'ai énormément apprécié apprendre la pathologie osseuse à tes côtés ces dernières années. Tes qualités humaines largement au-dessus de la moyenne et ta capacité à pouvoir mener plusieurs projets de front sont admirables. Merci encore pour ta disponibilité, ta bienveillance, et tes précieux conseils.

Sois assurée de l'admiration et du respect je te porte.

Aux membres du jury,

Madame le Professeur Marie FARUCH,

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

Je vous remercie pour votre expertise en radiologie ostéo-articulaire pour la réalisation de ce travail de thèse. J'espère qu'il vous donnera satisfaction.

Veillez trouver l'expression de mon profond respect.

Madame le Docteur Pauline ASSEMAT,

Je te remercie d'avoir accepté de participer à ce jury.

Ton savoir et tes nombreuses compétences scientifiques auront permis de sublimer ce travail. Merci pour ta gentillesse et ta bienveillance lors de nos réunions. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi.

Sois assurée de l'admiration et du respect je te porte.

Monsieur le Docteur Camille FRANCHET,

Je tenais à ta présence pour la fin de mon cursus d'interne. Je suis très heureux que tu aies accepté de siéger à ce jury de thèse. Je te remercie infiniment pour ta transmission de savoir dans ta discipline, ta pédagogie, ta gentillesse et tes conseils.

Sois assuré de mon profond respect et de ma profonde estime.

Aux personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail,

Christelle et l'équipe du CRB, merci pour votre patience et le temps précieux que vous avez dédié à la préparation de mes échantillons.

Nathalie, un grand MERCI pour ton implication sans faille, ta grande disponibilité et ta bonne humeur.

FX et toute ton équipe pour m'avoir donné accès et appris à me servir de toute cette technologie d'analyses d'images qui auront permis à ce projet de voir le jour.

REMERCIEMENTS PERSONNELS

A ma maman,

Si j'en suis arrivé jusque-là, c'est en grande partie grâce à ton amour sans faille, j'ai toujours pu compter sur toi dans tous les moments de ma vie, les bons mais aussi les moins bons. Tu as toujours été mon filet de sécurité et c'est ce qui m'a permis d'avancer sans jamais me retourner. Je t'aime.

A mon Papa,

Même l'on s'est un peu éloigné l'un de l'autre, j'ai toujours gardé et appliqué les valeurs que tu m'as inculqué durant mon enfance. Ce sont ces valeurs qui font ce que je suis devenu aujourd'hui et qui m'ont permis de me dépasser, d'aller toujours plus loin dans tous ce que j'ai pu entreprendre jusqu'ici. Je t'aime.

A ma petite sœur Camille,

Tu es la personne avec qui j'aurais absolument tout partagé jusqu'à mon départ, il y a 11 ans maintenant, pour étudier la médecine à Montpellier. Quand on était plus jeunes, je ne manquais pas une occasion de t'embêter (pour rester poli) mais c'était ma façon à moi de te prouver que je tenais énormément à toi. Je suis fier d'être ton frère. Je t'aime.

A Bernard,

Quand on s'est rencontré j'ai tout de suite accroché avec toi. Tu es quelqu'un d'exceptionnel humainement, tu essayes toujours de nous faire rire avec plus ou moins de succès... Tu as toujours fait passer notre famille avant tout le reste, je suis heureux que tu partages notre vie depuis tant d'années maintenant. Pour moi, tu seras toujours comme mon deuxième papa. Je t'aime.

A ma famille au sens large,

Merci à **Tatie Martine et Tonton Jojo** pour tous ces innombrables repas de famille passés et encore à venir, je ne m'en lasserai jamais ! Merci **cousin Sylvain** (mon grand frère de substitution) pour tous les shampoings qui ont traumatisé mon enfance mais aussi pour m'avoir emmené au collège au volant de ta Peugeot 106 de gros jacky tuning.

Merci **Myriam** pour ta joie de vivre, ton rire et tes petites anecdotes, mais aussi à ton coup de ciseau bien placé qui m'aura permis de ressembler à quelque chose à une certaine période.

Merci à **Tatie Dany et Tonton José** pour votre bienveillance et toutes ces après-midi piscine qui n'en finissaient jamais !

Merci à **ma Marraine** de prendre toujours des nouvelles de moi malgré l'éloignement, que des bons souvenir de mes visites à Prades.

Merci à mes grands-parents,

Mamie Cécile pour tout l'amour que tu m'as donné, ces parties de jeux de société, ces soirées à regarder les étoiles, ces balades dans les vignes de Pouzols. Je garde énormément de souvenir de toi malgré les années qui passent. Tu seras toujours dans mon cœur.

Papi Henri, je sais que tu auras un œil sur moi quand je deviendrai enfin Docteur, toi qui m'as toujours encouragé dans mes longues études, tu m'auras transmis la valeur du travail et sans ça, je n'en serai pas là aujourd'hui. Tu me manques énormément papi...

Papi Georges et Mamie Jeanine, les inséparables, ce sont tous ces supers souvenirs d'été à la maison de Sainte Marie qui me reviennent quand je pense à vous deux. J'espère vous rendre fier aujourd'hui en soutenant ma thèse, je sais que vous gardez un œil sur moi de là-haut. Je vous aime.

A mes amis de toujours,

Merci à toi **Rémi**, pour tous ces voyages, toutes nos soirées, tous nos délires... Je croyais ne pas avoir de frère mais c'était avant de te rencontrer... <3

Florian, mon premier coloc à Toulouse, mais pas seulement... On en aura fait des soirées pour mon début d'internat, ce n'était pas de tout repos !

David, ma jolie blonde qui a filé à l'anglaise... merci pour toutes ces après-midi à la piscine de ta grand-mère, on l'aura vraiment bien rentabilisé.

Mica, mon binôme d'arène, on en aura partagé des moments ensemble entre l'écoles, le judo, la natation, Wow, les cartes pokémon et j'en passe... Plein de bonheur pour ta petite famille !

Mon crew de perpi et d'ailleurs,

Léo, je me souviendrai toujours de nos folles soirées révisions PACES. On a partagé énormément de choses ensemble pendant ces 6 années d'externat, peut-être un peu trop même parfois ... Je ne suis pas venu à Marseille à ton grand damne mais ça n'aura rien changé à notre amitié. Je t'aime mon pote.

Clément, le seul sur qui je pouvais compter quand il s'agissait d'aller s'enjailler du côté de la colline des loisirs, mon gars sur ! Ta nouvelle vie d'infirmier à Cannes te réussit mon poulet, tu resteras toujours dans le haut de mon panier !

Alban, il n'y en a pas deux comme toi, un génie du mal qui ne sait pas faire les choses à moitié, le R2 Rooftop n'a qu'à bien se tenir... mon binôme de festival !

Adrian, mon binôme de festival bis pref !! On a vécu des moments « haut perché » ensemble ces dernières années, je sais qu'on sera toujours là l'un pour l'autre le reuf !

Maximilien, il n'aura fallu que quelques minutes pour que le courant passe aussi vite que la fibre optique, je regrette un peu le temps où tu m'avais rejoint à Toulouse, ce soir on va pouvoir remettre les pendules à l'heure ma biche.

Ben, durant les quelques moments passés ensemble, je pense que nous avons dû perdre en espérance de vie... On aura bien déconné ensemble avec (sur) Florian ! Heureux que ta nouvelle vie à Nantes se déroule comme tu le souhaites, petit weekend en prévision chez les Nantais !

Zaz, à nos belles années d'externat, à nos footings au stade, à nos bons gros tacos, à nos heures de fucking révisions à la vieille Fac... Tu vas faire un magnifique Papa mon Zaz à n'en pas douter, je te souhaite que du bonheur avec ta future petite famille !

Nico, c'est incroyable comment tu peux être bavard ! Mais j'adore t'écouter parler mon cochon, on se connaît depuis quasiment toujours tous les deux et l'externat nous aura permis de vraiment nous connaître et devenir de vrais amis !

A mes colocs,

Ulysse, je crois pouvoir dire que notre coloc s'est plus que bien passée ! J'ai rencontré quelqu'un avec beaucoup d'humour et avec des principes. Je te donne rendez-vous à Nouméa mon ami.

Arnaud, le gout de la fête et notre passion du foot aura été le fil conducteur de notre coloc. Très heureux de t'avoir rencontré ce soir d'anniversaire (même si tu nous as fait refoule de l'Ubu...)

Eva, Maude, Chloé, et **Thomas**, encore merci à vous 4 de m'avoir aussi bien intégré dans votre petite famille post internat Nîmois ! Je n'aurai pas pu rêver mieux pour ma parenthèse Montpelliéraine !

A mes amis Chtarbais,

Merci à tous les copains de Tarbes, que des gens de qualité supérieure avec qui ces petites soirées tisanes et jeux de sociétés du jeudi soir m'auront permis de rester sérieux dans cette dernière année d'internat. Merci aux membres du Chtarbais Fitness Club pour avoir m'avoir gardé dans une forme physique convenable cet hiver : **Guilhem, Joe, PH et Basou**, je vous aime les potes. Et petite dédicace, à toi **Lisa**, avec qui clairement ce semestre n'aurait pas été le même sans toi.

A mes co-internes actuels,

Anna, obligé de commencer par toi sinon tu risques de me faire la tête après ! Je suis fier d'avoir pu être ton co-interne pendant ces 5 ans. Tu auras toujours été là pour moi dans n'importe quelle situation, j'espère pouvoir garder ton amitié pour encore un bon paquet d'années même si nos chemins se séparent dans quelques jours <3

Pauline, le meilleur droit au remord qui nous ait rejoints ! Tu transpires la sérénité, comme quand il fallait se lever sur cette planche de surf durant ce weekend reposant du côté de Hossegor ! Je te passe le témoin, à toi de jouer maintenant !

Anne C, tu auras choisi le chemin le plus court et le plus aisé en choisissant de faire une carrière universitaire. Sache que j'ai pris les paris avec certains pour que dans une quinzaine d'années tu prennes la tête du service, alors ne me déçois s'il te plait !

Vinz, même si tu as pris la place de Samantha et que rien ne pourra effacer cette désillusion, sache que tes beaux yeux bleus ne m'auront pas laissé indifférent ...

Marine, ça aura été un vrai plaisir de partager ce bout d'internat avec toi, j'espère que mes diagnostics fenêtres ne t'auront pas trop découragé quand même !

Pierre, j'adore ta spontanéité (ou ton syndrome frontal ?), sans parler de tes chemises... je te garderai quelques petites anecdotes de Nouméa dont tu te délecteras d'écouter avec ton regard d'enfant recevant ses cadeaux.

Jessie, la fille la plus gainée du service, une beauté des îles dans notre laboratoire toulousain ! Je croyais avoir tout fait pour le muscle mais c'était avant de te rencontrer... Bon retour du côté Anapath !

Ronan, on aura partagé que ce dernier semestre ensemble, mais je sens une force « tranquille » qui émane de toi, un grand pouvoir implique de grandes responsabilités, sache-le.

Axelle, l'Oncopole a enfin trouvé sa miss, celle que j'ai attendu depuis le début de mon internat... Sans plaisanter (je ne plaisantais pas), tu dégages une grande sérénité, l'avenir de l'anapath toulousain est entre de bonnes mains.

Marie F, je suis heureux de te laisser les clés du rire et de la bonne humeur, je sais qu'avec toi, elles seront bien gardées. Je suis un peu déçu de ne pas pouvoir profiter encore quelques mois de ton grain de folie (non je déconne trop content de pouvoir me barrer à Nouméa !!!)

Claire L., Miss cocktail sans glaçon, mais aussi la Wonder woman de ce semestre ! On se sera soutenu l'un l'autre mais dans des domaines bien différents ! Une de mes plus belles découvertes lors de ces derniers mois d'internat ! Bon courage pour la fin de ton cursus, tu vas déchirer en tant qu'hématopath ! (A Créteil seriously ?!)

Nathalie et Marie N., les meilleures joueuses de futsal qu'il m'a été donné de voir ! J'ai kiffé passer ce dernier semestre à vos côtés, vous avez fait partie de la famille Oncopole très vite et ce n'est pas un hasard ! Je vous souhaite le meilleur pour la suite de vos aventures !

Samy, Anaïs, Clément, un petit vent de fraîcheur venu d'oncologie et de gastro entérologie, vous vous êtes supers bien intégrés et j'ai beaucoup apprécié votre bonne humeur ainsi que vos pelles d'or ! Mais on ne va pas se mentir, ce sont vos matinées en macroscopie qui m'auront donné le plus de satisfaction (le fardeau de tous les hors filières).

A mes anciens co-interne,

Quentin, ou le gendre idéal, toujours le mot pour rire (sacré Houbert), va falloir se refaire une soirée au biko avec ou sans vélib c'est comme tu veux cette fois !

Seb, le king de l'anapath, toujours là pour amuser la galerie, c'était compliqué de s'ennuyer avec toi ! Ta bonne humeur et ton rire m'auront manqué à mon retour de Tarbes.

Charlotte, tant de perfection ça me rend jaloux... Bref reste la même, un vrai rayon de soleil !

Claire R, jamais vu autant d'énergie positive chez quelqu'un et ce qui est remarquable, c'est que tu nous l'as partagé au quotidien ! J'ai adoré nos activités hors laboratoire, je te souhaite bon voyage dans la Drome !

Justine, mon binôme de soirée au Biko ! Ton Slam restera à jamais dans les mémoires... Dès le premier jour ça a matché entre nous, ton sourire et ta joie de vivre auront débordé sur moi. Je viendrais vous voir toi et ta petite famille sur Perpicity, le petit Alphonse a de la chance d'avoir une maman comme toi.

Alix, Gaby, Cécile, Aurore, et Gwendoline, merci les filles pour votre accueil dans le laboratoire et votre transmission de votre savoir macroscopique, je vous souhaite le meilleur dans vos vies respectives !

Mon petit Coco, on aura formé une grosse équipe macro à ton arrivé au laboratoire ! Je sais que je peux compter sur toi, merci pour ton soutien indéfectible et ton affection mon pote !

A mes anciens collègues hors filières et inter-CHU,

Antho Jack (Bazard Hémato Man), **Victor** (l'obsédé), **Maxence** (le cœur à prendre/Tinder), **Aris** (le tireur du dimanche), **Guillaume** (fête de la musique, rosé, pétanque, chopage), **Marion L.** (Perpignan le sang), **Charlotte** (Booba).

Laboratoire de Tarbes : Mme Siani, Hélène et Anne Marie, j'ai beaucoup apprécié de pouvoir travailler avec vous, merci pour votre bonne humeur et vos enseignements. Si je n'avais pas eu cette opportunité à Nouméa, je serais sûrement resté avec vous. Un grand merci aux secrétaires et techniciennes sans qui ce laboratoire ne serait pas le même.

Laboratoire de Montpellier : Merci à tous les médecins du laboratoire de Montpellier de Val d'Aurelle avec une mention très spéciale pour Lakhdar, l'anapath le plus curieux que je connaisse, j'ai beaucoup appris à ton contact, merci mon ami.

Laboratoire de l'Oncopole : un grand merci à tous les médecins du laboratoire qui m'auront transmis leur savoir avec beaucoup de pédagogie et de bienveillance, j'ai toujours éprouvé du plaisir à venir tous les matins au laboratoire. Merci également à tous les techniciens, les secrétaires et les cadres que j'ai eu la joie de côtoyer durant ces années.

TABLE DES MATIERES

I. GENERALITES	1
A. <i>L'ostéosarcome</i>	<i>1</i>
1. Epidémiologie	1
2. Symptômes	1
3. Topographie	2
4. Diagnostic anatomopathologique	3
5. Etiologie et facteurs de risques.....	6
6. Altérations génétiques	7
7. Prise en charge thérapeutique.....	8
8. Facteurs pronostiques	12
B. <i>Le microenvironnement tumoral</i>	<i>13</i>
1. Généralités.....	13
2. Remodelage osseux	14
3. Cellules Souches Mésoenchymateuses	16
4. Angiogenèse	19
5. Cellules immunitaires.....	20
C. <i>Etude du microenvironnement osseux et de la réponse à la chimiothérapie par techniques d'imagerie standard et de dernière génération : à l'ère de l'intelligence artificielle</i>	<i>27</i>
1. Les techniques standard	27
2. Nouvelles techniques d'IRM.....	30
3. TEP et TEP-SCAN	33
4. Perspectives à venir	33
5. Etude de la réponse à la chimiothérapie	34
6. Etude du microenvironnement macrophagique et ostéoclastique	36
II. OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	38
III.MATERIEL ET METHODES	39
A. <i>Population d'étude</i>	<i>39</i>
B. <i>Recueil de données cliniques et anatomopathologiques</i>	<i>39</i>
C. <i>Analyse spatiale et quantitative des TAMs, des lymphocytes T cytotoxiques et des vaisseaux</i>	<i>40</i>
1. Marquages immunohistochimiques Fluorescents multiplexes.....	40
2. Annotations des tumeurs numérisées	41
3. Analyse des images numériques (HALO®).....	42
D. <i>Evaluation radiologique du caractère ostéocondensant et/ou ostéolytique tumoral... ..</i>	<i>44</i>
1. Analyse radiologique manuelle	44
2. Analyse radiologique par segmentation	45
E. <i>Tests statistiques.....</i>	<i>49</i>
IV.RESULTATS	50
A. <i>Données cliniques</i>	<i>50</i>
B. <i>Analyse numérique multiplexe par fluorescence de l'hétérogénéité spatiale des cellules du microenvironnement tumoral sur les biopsies</i>	<i>51</i>

1.	Répartition des cellules ostéoblastiques SATB2+	52
2.	Répartition des lymphocytes T cytotoxiques CD8+	52
3.	Répartition des populations macrophagiques CD163+ et/ou CD68+	53
4.	Répartition des cellules endothéliales ERG +	55
C.	<i>Analyse radiologique manuelle</i>	56
D.	<i>Analyse radiologique par segmentation algorithmique</i>	57
E.	<i>Evaluation du ratio de macrophages CD163+/CD68+ et corrélation avec le caractère ostéocondensant sur l'imagerie</i>	58
1.	Distribution du ratio de macrophages CD163+ sur les OCs CD68+	58
2.	Corrélation entre le ratio de macrophages CD163+/CD68+ évalué sur la biopsie et le caractère ostéocondensant évalué sur l'imagerie par la méthode manuelle	59
F.	<i>Analyse numérique multiplexe par fluorescence de l'hétérogénéité spatiale des cellules du microenvironnement tumoral sur les pièces opératoires</i>	60
1.	Répartition des cellules ostéoblastiques SATB2+	60
2.	Répartition des lymphocytes T cytotoxiques CD8+	61
3.	Répartition des populations macrophagiques CD163+ et/ou CD68+	61
4.	Répartition des vaisseaux SMA +	64
V.	DISCUSSION	65
1.	Distribution des cellules du microenvironnement par rapport aux territoires OM et CL sur biopsie	65
2.	Corrélation entre les données microscopiques et d'imagerie sur biopsies	66
3.	Distribution spatiale du microenvironnement sur pièces opératoires	68
VI.	CONCLUSION	69
VII.	BIBLIOGRAPHIE	70

ABREVIATIONS

ADC	Apparent coefficient diffusion	OL	Ostéolytique
ADN	Acide désoxyribonucléique	OS	Ostéosarcome
ARNm	Acide ribonucléique messenger	PD-1	Programmed cell death 1
API-AI	Doxorubicine, cisplatine et ifosfamide	PDL-1	Programmed cell death ligand 1
BMPs	Bone Morphogenetic Protein	PM	Parties molles
BR	Bon répondeur	PTHrP	Parathyroid hormone related protein
BRCA	Breast cancer gene	RANK	Receptor Activator Of NF-Kb
CAF	Fibroblastes associés aux cancers	RANKL	Receptor Activator Of NF-Kb Ligand
CD163	Cluster Of Differentiation 163	RUNX2	Runt-Related Transcription Factor 2
CD99	Cluster Of Differentiation 99	SATB2	Special AT-rich sequence-binding protein-2
CD68	Cluster Of Differentiation 68	SBRT	Radiothérapie stéréotaxique d'ablation
CD8	Cluster Of Differentiation 8	RB1	RB Transcriptional Corepressor 1
CL	Cellulaire	RCP	Réunion de concertation pluridisciplinaire
CSF-1	Colony-stimulating factor 1	SLF	Syndrome de Li-Fraumeni
CSM	Cellule Souche Mésoenchymateuse	TAMs	Tumor-associated macrophages
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4	TEP	Tomographie à Emission de Positons
DF	Dysplasie Fibreuse	TKi	Inhibiteurs de tyrosine kinase
GSF	Groupe Sarcome Français	TB	Tumeur bénigne
GETO	Groupe d'Etude des Tumeurs Osseuses	TM	Tumeur maligne
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor 1 α	TME	Microenvironnement tumoral
IL	Interleukine	TNF α	Tumor Necrosis Factor α
IRM	Imagerie par résonance magnétique	TP53	Tumor Protein 53
HES	Hématoxyline - Eosine - Safran	VE	Vésicule extracellulaire
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor 1 α	VEGF	Vascular endothelial growth factor
MEC	Matrice extra cellulaire	VEGFR	Vascular endothelial growth factor Receptor
M-EI	Méthotrexate, étoposide et ifosfamide	ZA	Zolédronate
OC	Ostéoclaste		
OPG	Ostéoprotégérine		
M-CSF	Monocyte colony-stimulating factor		
MKI	Multi Kinase Inhibiteur		
MR	Mauvais Répondeur		
MTX	Méthotrexate		
NGS	Next Generation sequencing		
OCD	Ostéocondensant		
OCs	Ostéoclastes		
OM	Riche en ostéoïde		
OMS	Organisation Mondiale de la Santé		

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition des OS sur le squelette humain.....	2
Figure 2 : Sous-types histologiques des ostéosarcomes conventionnels (HE)	4
Figure 3 : Elaboration d'une matrice ostéoïde formant un réseau grêle en dentelle par les cellules ostéosarcomateuses. (OS conventionnel de haut grade)	5
Figure 4 : a, b, c : protocole de recoupe d'un os long après traitement par chimiothérapie ; d : protocole de recoupe d'un os plat après traitement par chimiothérapie (Gomez-Brouchet, GSF-GETO/RESOS, 2019)	10
Figure 5 : Evaluation de la réponse à la chimiothérapie selon la classification de Huvos et Rosen.	11
Figure 6 : Les caractéristiques du cancer (adapté de Hanahan & Weinberg).	13
Figure 7 : Cercle vicieux établi entre les cellules tumorales et les cellules responsables du remodelage osseux au cours du développement des ostéosarcomes (Verrecchia and Rédini, 2018).....	15
Figure 8 : Effets des cellules souches mésenchymateuse (CSM) sur les cellules d'ostéosarcome (OS) et la communication cellulaire (Xingyu Chang et Al, New perspective into mesenchymal stem cells: Molecular mechanisms regulating osteosarcoma, Journal of Bone Oncology 2021)	18
Figure 9 : Les différentes voies du VEGF dans l'ostéosarcome et cibles thérapeutiques potentielles	20
Figure 10 : (A) Le déséquilibre des ostéoclastes, des macrophages et des cellules bipotentes impliqués dans le remodelage osseux tumoral dans l'ostéosarcome (B) Effet inhibiteur de l'acide zolédronique (ZA) sur les ostéoclastes CD68+/CD163- délétères et les macrophages (Gomez-Brouchet et Al, 2021).	24
Figure 11 : Protocole de traitement dans l'essai Sarcoma13/OS2016, en fonction de l'âge chez des patients avec OS à haut- risque (métastatique ou mauvais répondeurs à la chimiothérapie). (Brard et al., 2019)	26
Figure 13 : TDM montrant la minéralisation de la matrice tumorale, la condensation du corps vertébral et l'extension dans les tissus mous pré vertébraux.	28
Figure 12 : Radiographie OS mixte avec minéralisation prédominant dans les tissus mous (éperon de Codman : flèche)	28
Figure 14 : OS de l'extrémité distale du fémur en pondération T1.	29
Figure 15 : Rehaussement au ferumoxytol d'un sarcome osseux corrélé avec la densité des TAMs CD68+ et CD163+ à l'histopathologie (Aghighi et Al, Clin Cancer Res., 2018 Sep)..	37
Figure 16 : Annotations faites sur la lame colorée à l'HE numérisée (CaseViewer) puis retranscrites sur la lame colorée à l'IF (HALO®)	42
Figure 17 : Détection et quantification des marquages par 2 modules différents (HALO®) .	43
Figure 18 : OS conventionnel de haut grade du fémur distal.	45
Figure 19 : Segmentation 2D de la tumeur (vert) à partir d'une coupe coronale sur l'IRM...	46
Figure 20 : Registration ou recalage des images IRM et TDM.....	47
Figure 21 : Segmentation 2D des zones OL (bleu) et OCD (rouge) sur la coupe coronale du TDM	48
Figure 22 : Segmentation 3D des territoires OL (bleu) et OCD (rouge) à partir de la première segmentation de la tumeur (vert).....	49
Figure 23 : Comparaison de la densité en cellules ostéoblastiques SATB2+ entre les zones cellulaires (CL) et riches en ostéoïde (OM).	52
Figure 24 : Distribution en % des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ sur la population cellulaire globale étudiée entre les zones cellulaires (CL) et riches en ostéoïde (OM).	53
Figure 25 : Populations de macrophages, lymphocytes T cytotoxiques, et cellules ostéoblastiques étudiées par immunohistochimie multiplex sur biopsies.	54

Figure 26 : Comparaison de la densité en cellules endothéliales ERG+ sur la surface étudiée entre les zones cellulaires (CL) et riches en ostéoïde (OM).	55
Figure 27 : Distribution du ratio de macrophages CD163+ / OCs CD68+ en fonction du type de zone cellulaire (CL) et riches en ostéoïde (OM).	58
Figure 28 : Représentation du pourcentage d'ostéocondensation en fonction du ratio CD163/CD68. Les courbes en pointillés ainsi que la droite en trait plein représentent la régression linéaire de ces deux variables.	59
Figure 29 : Distribution en % de surface marquée par SATB2+ sur la surface totale étudiée entre les zones de bonne réponse et de mauvaise réponse.	60
Figure 30 : Distribution en % de surface marquée par CD8+ sur la surface totale étudiée entre les zones de bonne réponse et de mauvaise réponse.	61
Figure 31 : Populations de macrophages, lymphocytes T cytotoxiques, et cellules ostéoblastiques étudiées par immunohistochimie multiplex sur pièces opératoires.	63
Figure 32 : Distribution en % de surface marquée par SMA+ sur la surface globale étudiée entre les zones de bonne réponse et de mauvaise réponse	64

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification histologique des OS dans l’OMS 2020.....	3
Tableau 2 : Evaluation de la réponse à la chimiothérapie selon la classification de Huvos et Rosen.....	11
Tableau 3 : Résumé des différentes techniques IRM de nouvelle génération	30
Tableau 4 : Résumé des caractéristiques cliniques des patients analysés.....	51
Tableau 5 : Données récoltées sur l’analyse radiologique classique	56
Tableau 6 : Comparaison des 6 cas analysées en méthode manuelle et par segmentation	57

I. GENERALITES

A. L'ostéosarcome

1. Epidémiologie

L'ostéosarcome (OS) est la plus fréquente des tumeurs malignes primitive osseuse **(1-3)**. L'incidence est de 3.4 nouveau cas pour 1 000 000 d'habitants par an dans le monde **(4)**. Il existe deux pics d'incidence en fonction de l'âge. Le pic principal survient chez l'adolescent et l'adulte jeune entre 15 et 19 ans avec une incidence maximale de 8 à 11 cas par an pour 1 000 000 habitants **(5)**. L'OS touche alors préférentiellement les garçons (sex-ratio : 1.3 :1) **(3)**. L'OS est rare avant l'âge de 5 ans **(6)**. Le deuxième pic d'incidence s'observe chez les personnes âgées de plus de 60 ans **(4)**. Il s'agit alors, dans la moitié des cas, d'OS secondaires développés sur une pathologie osseuse préexistante (maladie de Paget, dysplasie fibreuse, tumeur osseuse bénigne, infarctus osseux, ...) ou après radiothérapie **(7,8)**.

2. Symptômes

La douleur est le signe clinique révélateur le plus fréquent. Elle est profonde, récurrente, pouvant s'étaler sur plusieurs semaines à plusieurs mois. On peut également retrouver à l'examen clinique une masse palpable, une limitation des mouvements articulaires, des douleurs à la mise en charge, une chaleur localisée et un érythème **(9)**.

Une augmentation soudaine de la taille tumorale est généralement attribuable à des changements secondaires tels qu'une hémorragie intra-lésionnelle. Une fracture pathologique due à la tumeur primitive ou à des « skips » métastases survient dans environ 5 à 10% des cas **(10,11)**. La présentation clinique des OS télangiectasiques et des OS à petites cellules est similaire à l'ostéosarcome conventionnel. Les fractures pathologiques sont plus fréquentes dans les OS télangiectasiques (30%) **(12,13)**.

Les signes généraux traditionnels du cancer comme la perte de poids et la fièvre, ne sont généralement présents que dans les OS avancés et sont peu présents chez les jeunes patients **(14)**.

3. Topographie

Les ostéosarcomes peuvent survenir sur n'importe quel type d'os. Chez les adolescents, les OS se développeront préférentiellement au niveau des métaphyses des os longs, près des plaques de croissance. La localisation la plus fréquente se situe autour du genou (30% au niveau du fémur distal et 15% au niveau du tibia proximal). Au niveau du membre supérieur, les OS se développent préférentiellement au niveau de l'humérus proximal dans environ 15% cas. D'autres emplacements comme le crâne ou la mâchoire (8%) et le bassin (8%) sont plus rares. Seulement 1,25% des ostéosarcomes sont d'origine costale (1).

L'ostéosarcome de la mâchoire diffère des autres OS des os longs par une survenue plus tardive, un risque métastatique moins important, et une meilleure survie. Le risque de récurrence locale est par contre plus important (15).

La répartition des OS sur le squelette est résumée dans la figure 1.

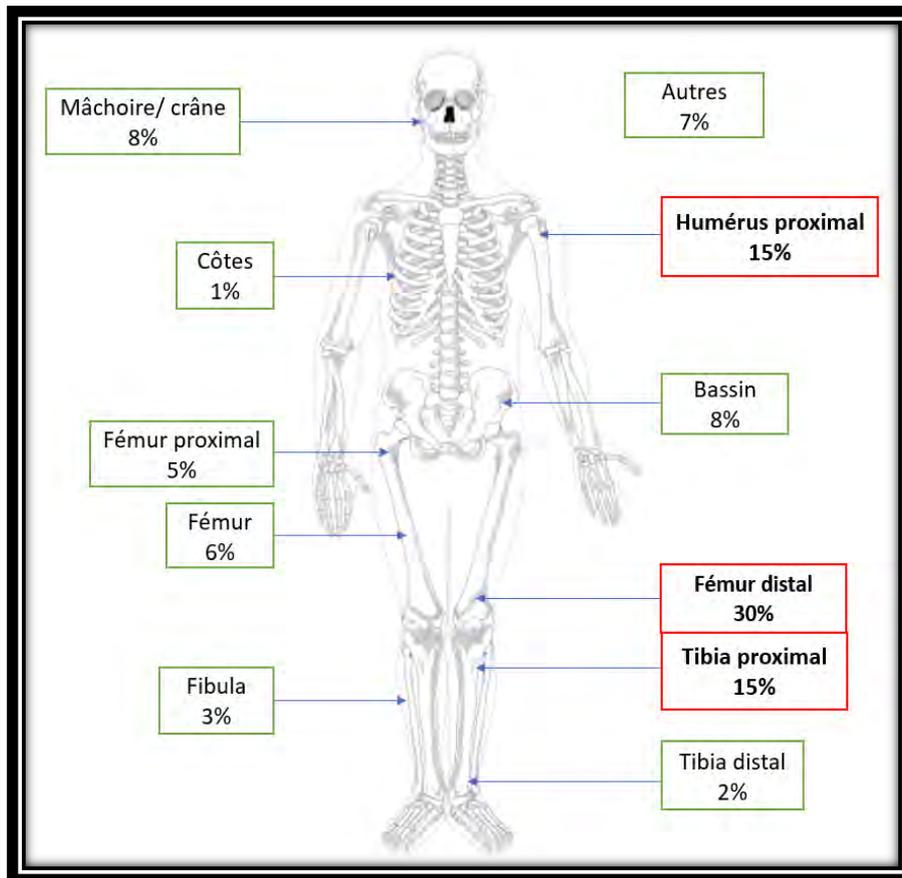


Figure 1 : Répartition des OS sur le squelette humain

4. Diagnostic anatomopathologique

a. Classification histologique OMS 2020

La nouvelle classification de l'OMS différencie les OS en fonction de leur localisation sur l'os, et de leur grade de malignité. Elle distingue ainsi, les OS centraux (intra-médullaire) et les OS de surface. Les OS primitifs (centraux ou de surface) sont traités dans un chapitre différent des OS secondaires (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification histologique des OS dans l'OMS 2020

	Sous-types	Grade	Fréquence
OS CENTRAUX	OS central de bas grade	Bas grade	1-2 %
	OS Conventionnel primitif	Haut grade	85-90 %
	OS Télangiectasique		2-12 %
	OS à petites cellules		1,5 %
OS DE SURFACE	OS Paraostéal	Bas grade	4 %
	OS Périosté	Grade intermédiaire	< 2%
	OS de haut grade de surface	Haut grade	< 1%
OS SECONDAIRES	Maladie de PAGET	Haut grade	0,7-6.3 %
	Territoires irradiés		
	Infarctus ; OMC ; DF		

Les OS centraux peuvent être de bas grade (1-2%), ou de haut grade de sous type conventionnel, télangiectasique ou à petites cellules.

Les OS conventionnels sont les plus fréquents et représentent 85-90 % de tous les OS.

On dénombre chez les OS conventionnels trois sous types principaux en fonction de la matrice prédominante produite par les cellules tumorales (Figure 2) :

- OS ostéoblastiques (76 – 80%)
- OS chondroblastique (10 – 13%)
- OS fibroblastique (10%)

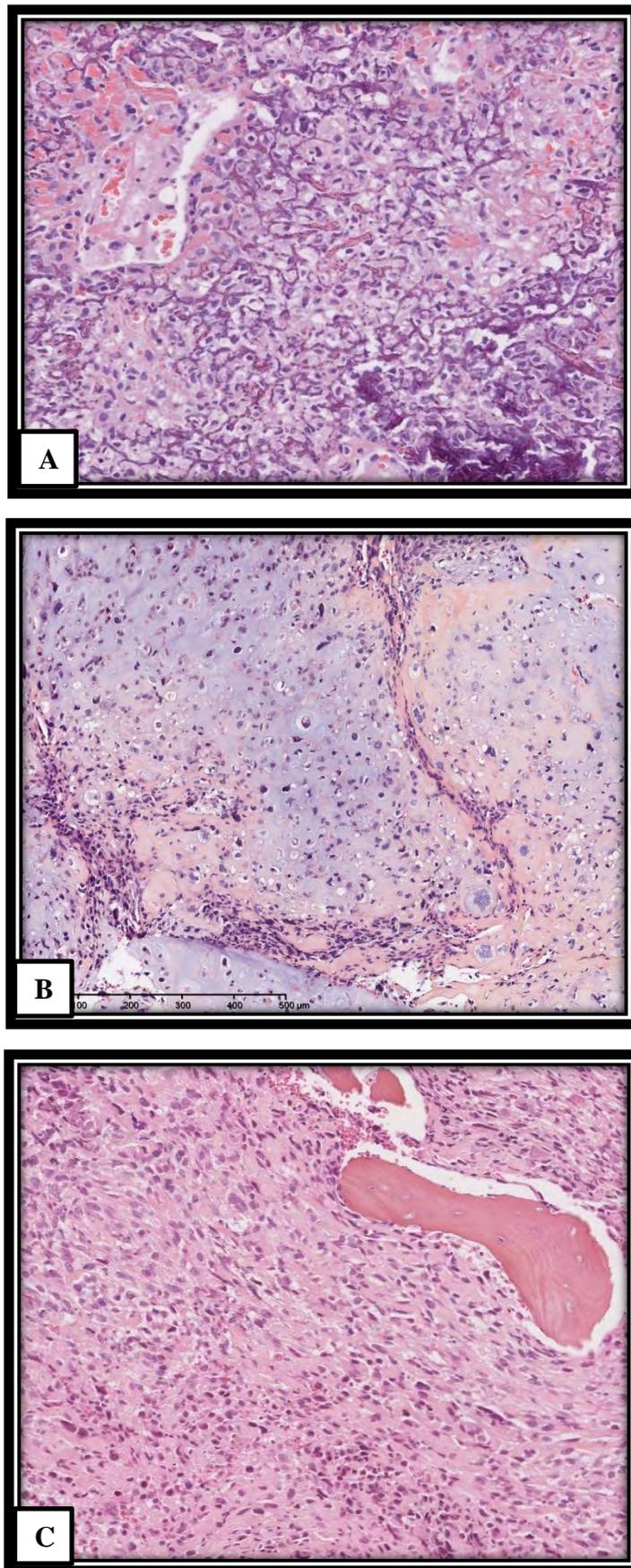


Figure 2 : Sous-types histologiques des ostéosarcomes conventionnels (HE)
(A) OS ostéoblastique (x20). (B) OS chondroblastique (x10). (C) OS fibroblastique (x20).

Ces différents sous-types histologiques n'ont aucune relation avec le traitement ou le pronostic de la maladie.

D'autres variantes histologiques plus rares sont décrits dans les OS conventionnels qui posent des problèmes de diagnostic différentiel avec les autres tumeurs primitives osseuses :

- Riche en cellules géantes
- Epithélioïde
- Ostéome-like
- A cellules claires
- Chondroblastome-like

b. Diagnostic histologique

L'OS conventionnel peut adopter des morphologies histologiques variées. L'identification d'une matrice ostéoïde d'origine néoplasique est essentielle au diagnostic. La tumeur prolifère dans la cavité médullaire, détruit les travées osseuses et s'étend jusqu'à la corticale en infiltrant les trous de Havers. Les cellules néoplasiques possèdent souvent des atypies nucléo-cytoplasmiques et un pléomorphisme marqué. Elles peuvent prendre un aspect fusiforme, plasmocytotoïde, ou épithélioïde, mais également d'ostéocyte « bénin » notamment lorsqu'elles sont entourées d'une matrice ostéoïde. L'activité mitotique est habituellement augmentée, avec de nombreuses mitoses atypiques.

La substance ostéoïde (matrice osseuse non minéralisée immature) est éosinophile, d'abondance variable en fonction du grade ou du sous type histologique. Dans l'OS conventionnel, elle se présente sous la forme d'un réseau grêle dit en « dentelle » disposé entre les cellules tumorales (Figure 3).

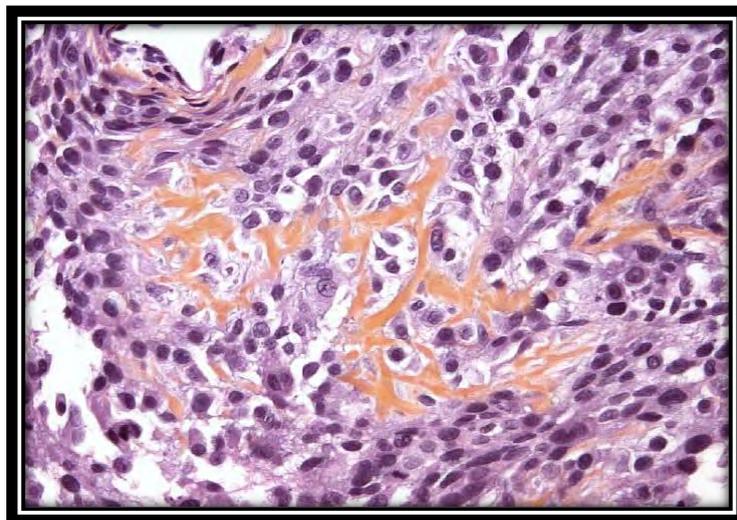


Figure 3 : Elaboration d'une matrice ostéoïde formant un réseau grêle en dentelle par les cellules ostéosarcomateuses. (OS conventionnel de haut grade)

Les OS conventionnels ont un profil immunohistochimique peu spécifique. Les antigènes le plus souvent exprimés sont SATB2, ostéocalcine, ostéonectine, ostéoprotégérine, RUNX2, S100, actine et CD99 (16,17). SATB2 est un marqueur très sensible (94%) de la différenciation ostéoblastique et donc des ostéosarcomes mais manque de spécificité, retrouvé positif dans d'autres sarcomes et tumeurs osseuses primitives. Cependant ce manque de spécificité (50%) pourrait suggérer que des sarcomes de haut grade indifférenciés exprimant le SATB2 seraient des ostéosarcomes produisant trop peu de matrice osseuse pour être détecté au microscope optique (18).

5. Etiologie et facteurs de risques

A ce jour, l'étiologie est encore méconnue même si de nombreuses théories ont été émises à partir d'observations expérimentales. Des facteurs de risques ont pu être mis en évidence par des études épidémiologiques permettant d'étoffer différentes hypothèses.

a. Croissance et poids de naissance

Différentes études ont montré qu'une taille plus élevée que la moyenne au diagnostic ainsi qu'un poids de naissance élevé ($\geq 4,046$ g) étaient des facteurs de risque de développement d'OS (19). Ces corrélations suggèrent que les facteurs de croissance et / ou la croissance osseuse rapide à la fois à la puberté et in utero pourraient jouer un rôle dans la pathogenèse du cancer. Le pic d'incidence chez les adultes jeunes préférentiellement associé à un développement métaphysaire ne fait que renforcer cette hypothèse.

b. Pathologies osseuses préexistantes et post-irradiation

La maladie de Paget est la principale pathologie osseuse responsable d'OS secondaire. Elle est caractérisée par un remodelage osseux accru lié à une activité ostéoclastique anormale. Approximativement 1 % des patients pagétiques développeront un ostéosarcome. Il a été estimé que 20 % des patients de plus de 60 ans atteints d'ostéosarcome ont une maladie de Paget comme condition prédisposante (8).

c. Syndromes de prédisposition génétiques

Le syndrome de Li-Fraumeni (SLF), syndrome autosomique dominant dû à des mutations du gène suppresseur de tumeur p53 est associé à un risque extrêmement élevé de cancers au cours de la vie dont de survenue d'un OS (20). Le SLF a été détecté dans environ 5 % des cas d'ostéosarcome chez les moins de 30 ans, et l'ostéosarcome est le sarcome le plus fréquent chez les personnes atteintes de SLF (21).

Le rétinoblastome héréditaire est un trouble autosomique dominant causé par une mutation germinale du gène RB1 provoquant un rétinoblastome bilatéral à l'âge moyen de 1 an (22). Bien que les enfants atteints de rétinoblastome héréditaire aient un excellent taux de survie, ils présentent un risque accru de développer des sarcomes des os et des tissus mous, notamment un OS (23). Ce risque est attribué à des facteurs génétiques, à la radiothérapie et à la chimiothérapie, la radiothérapie étant le principal facteur de risque (24).

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-Thompson est causée par des mutations germinales bialléliques dans RECQL4, et est fortement associée à une prédisposition aux OS (25).

Le syndrome de Bloom est caractérisé par une petite taille, une éruption cutanée par hypersensibilité au soleil. Il est causé par des mutations du gène BLM, qui est une hélicase RecQ (26). Alors que la majorité des cancers chez BLM sont des carcinomes, des leucémies et des lymphomes, le taux d'OS est plus élevé que dans la population générale (27).

Le syndrome de Werner, connu sous le nom de progéria adulte, est caractérisé par un vieillissement prématuré, des cataractes bilatérales, de l'ostéoporose, une petite taille et des changements cutanés semblables à la sclérodémie. Le syndrome de Werner est dû à des mutations du gène WRN, qui est une hélicase RecQ, situé sur le chromosome 8p11.1. Les patients atteints du syndrome de Werner sont susceptibles d'être atteints de plusieurs cancers, dont l'OS (28).

6. Altérations génétiques

L'ostéosarcome se caractérise par une aneuploïdie chromosomique très complexe et une hétérogénéité à la fois intertumorale et intratumorale due à une grande instabilité chromosomique (29). Une étude récente par séquençage haut débit a identifié 67 gènes drivers différents dans une série de 112 OS (30). Certaines mutations, peu nombreuses sont récurrentes tel que des mutations de TP53 (>90%) et RB1 (50%), jouant un potentiel rôle dans le développement initial des OS (31). D'autres mutations récurrentes ont été identifiées (MDM2, ATRX et NF2).

Des anomalies du nombre de copie sont généralement observées, notamment des amplifications dans certaines régions, avec des gains de bras chromosomiques 6p (40-50%, portant RUNX2, VEGFA, E2F3 et CDC5L), 8q (45-55%, MYC) et 17p (32). Des délétions géniques récurrentes comme LSAMP, DLG2 et WWOX sont aussi rapportées.

Récemment, un sous-ensemble d'OS a été décrit avec des altérations génomiques dans les gènes des voies de réparation de l'ADN, rappelant les tumeurs déficientes en BRCA1/2 (33).

Des études de séquençage apportent la preuve que le phénomène de « chromoanagénèse » (chromothripsie/chromoplexie) serait le mécanisme moléculaire à l'origine de la complexité chromosomique de l'OS dans > 90% des cas (30). Ce phénomène correspond à un événement chaotique et se caractérise par une fragmentation importante et soudaine d'une partie ou de la totalité des chromosomes, suivie d'un réassemblage aberrant. Le déclenchement du processus lui-même reste encore inconnu.

Il semblerait déclenché par des erreurs dans la ségrégation mitotique des chromosomes (formation de micronoyaux contenant des chromosomes entiers) et associé à des mutations inactivatrices de TP53.

La « Kataegis », un phénomène d'hypermutations localisées, est aussi rapporté dans 50% des OS (31).

7. Prise en charge thérapeutique

La prise en charge thérapeutique des patients atteint d'OS est discutée en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) mettant en coordination plusieurs spécialistes tel que des oncologues, radiologues, chirurgiens, pathologistes... La RCP a lieu avant la biopsie puis après la fin de la chimiothérapie néoadjuvante lorsqu'elle est réalisée. Le bilan préopératoire d'extension local repose sur une première imagerie par résonance magnétique (IRM) réalisée avant la biopsie diagnostique, puis une autre fois 6 semaines avant la chirurgie. Une tomодensitométrie (TDM) thoracique à la recherche d'une possible localisation secondaire est également souvent réalisée.

Avant les années 1970, les patients atteints d'OS de haut grade étaient uniquement traités par chirurgie, avec une survie sans événement estimée à 20 % (34). Depuis, est associée à la chirurgie une chimiothérapie. La chimiothérapie multimodale a augmenté la survie sans maladie à 5 ans de 10%-20% à > 60%. Dans les protocoles et directives européennes actuelles, la chimiothérapie est utilisée avant et après la chirurgie (35).

Depuis l'avènement de la chimiothérapie dans la prise en charge des OS, les taux de survie n'ont pas évolué au cours des quatre dernières décennies, et le pronostic reste médiocre pour 25% des patients souvent en rechutes métastatiques. Par conséquent, l'amélioration des thérapeutiques reste un objectif majeur pour augmenter la survie des patients.

a. Chimiothérapie

En France, le schéma de chimiothérapie utilisé pour le traitement dépend de l'âge. Les enfants/adolescents sont traités avec la combinaison de méthotrexate (MTX), étoposide et ifosfamide (M-EI), (36) tandis que les adultes reçoivent une combinaison de doxorubicine, cisplatine et ifosfamide (API-AI) (37). Ces protocoles constituent la chimiothérapie néoadjuvante de l'ancien essai clinique randomisé de phase III Sarcome-09/OS2006 (38) ainsi que de l'essai actuel de phase II Sarcome-13/OS2016 (39). La durée moyenne du traitement avant chirurgie est de 13 semaines.

La chimiothérapie adjuvante est adaptée au statut métastatique au moment du diagnostic et, pour les patients ayant une maladie localisée, au niveau de la réponse histologique à la chimiothérapie néoadjuvante selon le grading de Huvos et Rosen.

b. Chirurgie

La prise en charge chirurgicale arrive rapidement après la fin de la chimiothérapie néoadjuvante. L'opération devra être supervisée par une équipe chirurgicale spécialisée et expérimentée dans les tumeurs osseuses. Une résection/reconstruction dans le même temps sera privilégiée par le chirurgien dans la mesure du possible. Les techniques conservatrices visent à exciser largement la tumeur en respectant des marges minimales de 2 mm selon les recommandations du GROUPOS et du GSF-GETO/RESOS (40). Il est également préférable que la résection emporte le trajet de la biopsie afin de réduire le risque de récurrence locale. Si cela ne peut être réalisé, l'amputation est alors indiquée.

La reconstruction fait appel aux techniques utilisées habituellement en chirurgie orthopédique : ostéosynthèses, greffes osseuses (auto et allogreffe), prothèses plus ou moins massives, association de prothèses et d'allogreffes (reconstruction composites), péroné vascularisé, arthro-dèse... Le choix de la méthode se fera en fonction de l'âge du patient, de la localisation et du pronostic.

Une fracture pathologique est associée à une diminution de la survie dans les OS, mais n'implique pas nécessairement une amputation. Dans le cas de tumeurs répondant bien au traitement néoadjuvant, on peut espérer une réduction de l'hématome fracturaire et ainsi permettre une résection/reconstruction (41).

c. Evaluation anatomopathologique

La pièce opératoire est envoyée au laboratoire de pathologie. La prise en charge anatomopathologique de la pièce (42) fait l'objet d'un protocole qui doit permettre d'évaluer la réponse à la

chimiothérapie néo adjuvante, la qualité des marges de résection et la présence ou l'absence d'embolie intravasculaire (43).

Protocole macroscopique :

La première étape du protocole consiste à orienter et mesurer la pièce. Pour les os longs, une coupe médiane totale passant par le plan frontal de la pièce sera effectuée. Sur les deux hémipèces restantes, deux plans de coupe perpendiculaires à la première tranche de section frontale seront faits suivant un plan longitudinal ou transversal. La tumeur est mesurée dans ses plus grandes dimensions. Une photographie des différentes sections sera ensuite effectuée pour cartographier de façon précise les différents prélèvements.

La tranche de section frontale et les deux demi-tranches de sections perpendiculaires sont découpées selon un quadrillage, puis incluses en totalité dans des petits ou grands blocs selon les cas.

Les différents prélèvements sont repérés et orientés sur la photographie des tranches de section ou sur un schéma (Figure 4).

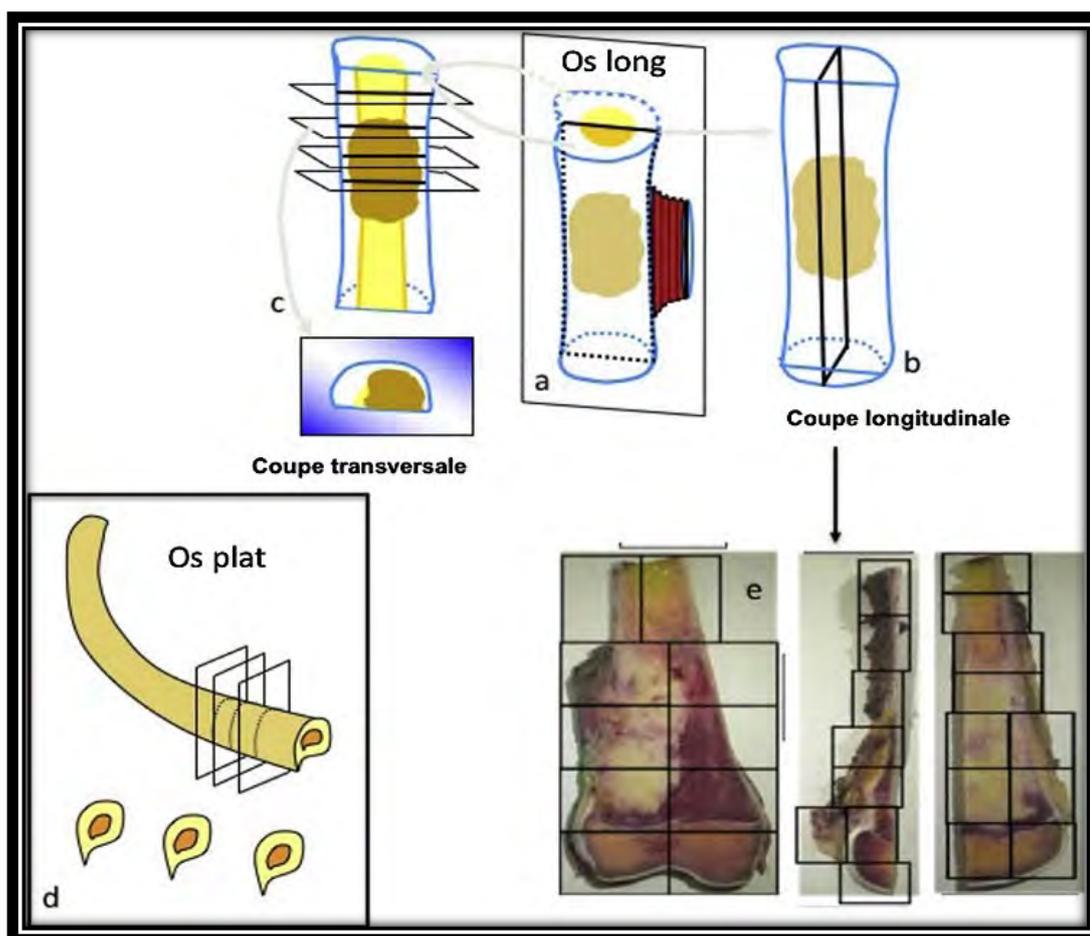


Figure 4 : a, b, c : protocole de recoupe d'un os long après traitement par chimiothérapie ; d : protocole de recoupe d'un os plat après traitement par chimiothérapie (Gomez-Brouchet, GSF-GETO/RESOS, 2019)

d. Evaluation de la réponse à la chimiothérapie

L'évaluation de la réponse à la chimiothérapie, se fera par analyse microscopique des différents prélèvements en grille effectués sur les tranches de section (Figure 4). Le pourcentage de cellules nécrosées sera calculé sur chacun des prélèvements. Une moyenne arithmétique des différents pourcentages obtenus sur chacun des prélèvements est ensuite réalisée permettant de définir le grade de Huvos et Rosen (44,45) (Tableau 2 ; Figure 5).

Tableau 2 : Evaluation de la réponse à la chimiothérapie selon la classification de Huvos et Rosen

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)

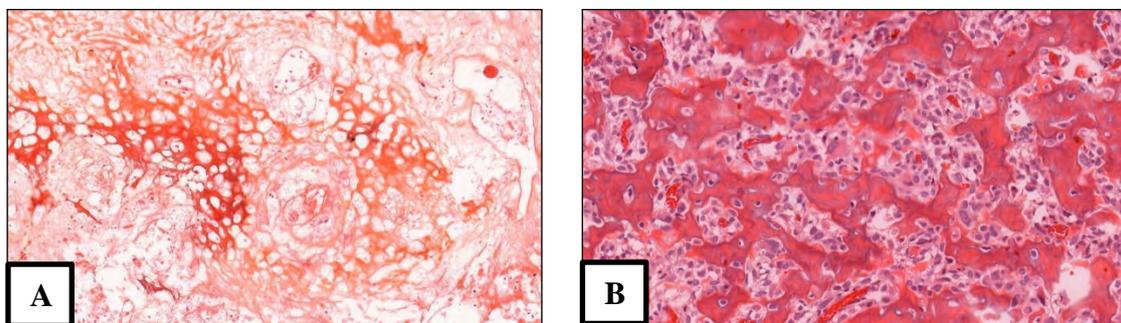


Figure 5 : Evaluation de la réponse à la chimiothérapie selon la classification de Huvos et Rosen.

(A) Bonne réponse : absence de cellule tumorale viable résiduelle.

(B) Mauvaise réponse : persistance de cellules tumorales viables.

e. Radiothérapie

L'OS est une tumeur qui est peu radiosensible. En première intention, la radiothérapie ne fait pas partie des options thérapeutiques lorsque la tumeur est résécable. Cependant elle peut, en association avec la chimiothérapie, être utilisée lorsque la résection est non réalisable ou incomplète permettant ainsi un meilleur contrôle local de la maladie (46). La radiothérapie stéréotaxique d'ablation (SBRT) donne de très bons résultats dans le contrôle local des métastases pulmonaires avec des doses peu toxiques (47). La radiothérapie peut être également utilisée à visée antalgique pour les métastases osseuses douloureuses (48).

8. Facteurs pronostiques

a. Métastases

La présence de métastase au cours de la maladie impacte fortement le pronostic. Les patients qui présentent une maladie métastatique ont une survie globale d'environ 20 à 30% contre 70 à 80% chez les patients non métastatiques (49).

Elles sont dans plus de la moitié des cas de localisation pulmonaire. Elles peuvent également être de localisation osseuse soit sur le même os (skip métastase) soit à distance. Le fait que la métastase soit résecable améliore le pronostic (50).

b. Réponse à la chimiothérapie

Le deuxième facteur pronostic le plus important pour la survie dans l'OS est la réponse à la chimiothérapie. Cette évaluation de la réponse thérapeutique est décrite dans un paragraphe plus haut dans le texte. Les patients présentant une nécrose supérieure 90% ont une meilleure survie globale par rapport à ceux qui ont une réponse histologique inférieure (51).

c. Autres facteurs

Plusieurs études ont mis en avant d'autres facteurs de mauvais pronostics chez les patients atteints d'OS comme un âge avancé, le sexe masculin, la taille tumorale, la localisation axiale, une amputation ou l'absence de résection (52). L'évaluation de la qualité des marges de résection ainsi que la détection de possibles embolies sur la pièce de résection peuvent également avoir un impact sur le pronostic (53,54).

d. Limites des facteurs pronostics actuels

Aujourd'hui, les outils pronostiques histologiques sont limités car ils n'interviennent qu'après l'analyse de la pièce opératoire. A ce stade, les possibilités thérapeutiques sont plus restreintes après une chimiothérapie néo-adjuvante et une résection chirurgicale. L'élaboration d'un score pronostique pré-thérapeutique au moment du diagnostic est nécessaire, ce qui permettrait de s'orienter vers un traitement plutôt qu'un autre. La forte hétérogénéité intra et inter tumorale ne facilite pas l'élaboration d'un tel score. Le microenvironnement tumoral joue un rôle important dans le développement tumoral ainsi que dans la réponse au traitement. Plusieurs équipes, comme celle de Gomez-Brouchet et al, ont identifiés des facteurs pronostics liés au TME (55). L'étude et la compréhension de ce TME devrait permettre d'utiliser efficacement les nouvelles thérapies développées (anti-checkpoint immunitaires, immunomodulateurs, inhibiteurs de tyrosine kinase (TKi) ...).

B. Le microenvironnement tumoral

1. Généralités

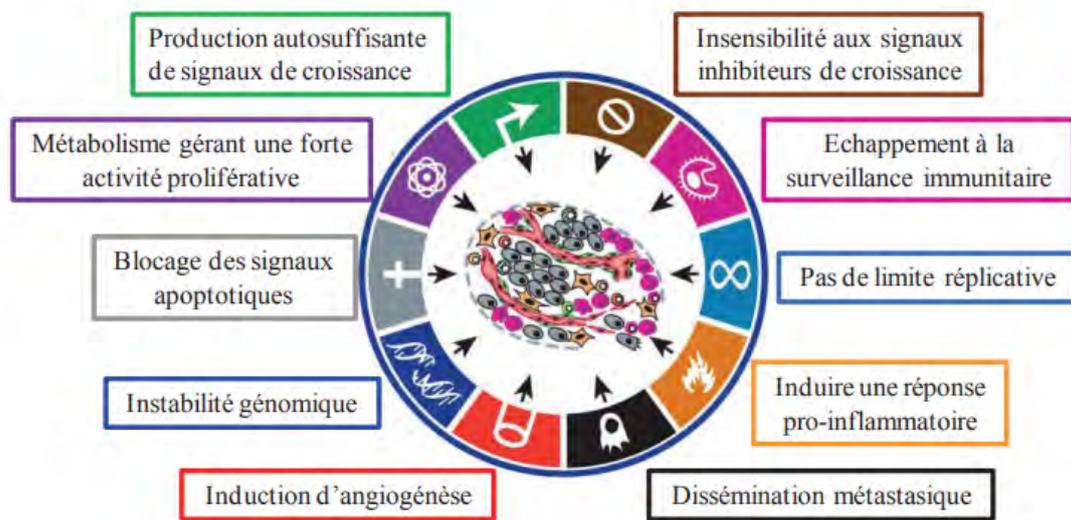


Figure 6 : Les caractéristiques du cancer (adapté de Hanahan & Weinberg).

Le concept de microenvironnement tumoral (TME) remonte à 1863, lorsque Virchow a émis l'hypothèse d'une relation entre l'inflammation et le cancer, et à 1889, lors de l'émergence de la théorie de Paget du "seed and soil". Cette dernière théorie impliquait que l'initiation et la progression du cancer se concentraient non seulement sur la cellule cancéreuse, "la graine", mais aussi sur "le sol", dans lequel elle puisait ses nutriments, son oxygène et les signaux nécessaires à sa croissance et à son développement. En 2011, Hanahan et Weinberg ont rajouté à la liste classique des 6 caractéristiques biologiques acquises responsables du développement en plusieurs étapes du cancer, deux autres caractéristiques : la reprogrammation du métabolisme énergétique et l'évitement de la destruction immunitaire. Ils ont ainsi introduit la notion que les tumeurs présentaient une autre dimension de complexité qui était de contenir des cellules du microenvironnement apparemment normales, qui contribuaient au développement tumoral (Figure 6). La compréhension du TME est ainsi devenue ces dernières années un sujet de recherche privilégié (56). Le TME est composé d'une proportion variable de cellules tumorales, de cellules stromales (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules immunitaires), de cytokines et de chimiokines, dans les cancers. Le tissu osseux est un milieu complexe où, différentes populations cellulaires interagissent pour maintenir l'homéostasie osseuse, telles que les cellules du remodelage osseux, les cellules souches mésenchymateuses (CSM), les cellules immunitaires, les cellules hématopoïétiques, et les cellules du microenvironnement vasculaire. Dans les cancers et dans l'ostéosarcome, la progression, l'invasion, la survenue de métastases et la résistance aux traitements des cellules tumorales sont liées à l'interaction bidirectionnelle entre les cellules

tumorales et le TME, mais aussi avec la matrice extracellulaire (MEC), les cytokines et chimiokines du TME (57).

Nous allons ici exposer les spécificités du microenvironnement tumoral osseux en décrivant les sous-populations cellulaires les plus importantes décrites dans le microenvironnement de l'OS, ainsi que les axes thérapeutiques qu'elles laissent entrevoir.

2. Remodelage osseux

Le microenvironnement osseux joue un rôle important dans le développement des OS où il est clairement établi qu'il existe une dérégulation du remodelage osseux orchestré par la balance RANKL/OPG (RANKL activateur des ostéoclastes (OCs) et de la résorption osseuse, exprimé par les ostéoblastes et présent sous forme soluble et OPG qui inhibe l'interaction RANK/RANKL en séquestrant RANKL, favorisant la formation osseuse). En effet, les cellules cancéreuses piratent le microenvironnement tumoral en faveur d'une augmentation de la résorption osseuse médiée par les OCs, afin qu'il devienne favorable à leur développement. L'ostéolyse est médiée par une hyperactivité des OCs, consécutive à la sécrétion de différents facteurs pro-ostéoclastiques d'origine tumorale, tels que RANKL, l'Interleukine 6 (IL-6), l'IL-11, le TNF α (Tumor Necrosis Factor α), les BMPs (Bone Morphogenetic Protein) ou la PTHrP (parathyroid hormone related protein). Ces différents facteurs auront une action directe, ou indirecte sur les OCs via l'activation des ostéoblastes qui augmentent en réponse, la production de RANKL (Figure 7). À la suite de ce processus, les facteurs de croissance piégés dans la matrice osseuse, tels que le facteur de croissance transformant- β (TGF- β), sont libérés dans le microenvironnement osseux et stimulent la croissance tumorale et la progression métastatique (58). Il s'installe alors un cercle vicieux entre la résorption osseuse impliquant les ostéoblastes et les OCs et la prolifération des cellules tumorales, permettant un développement rapide de la tumeur (59).

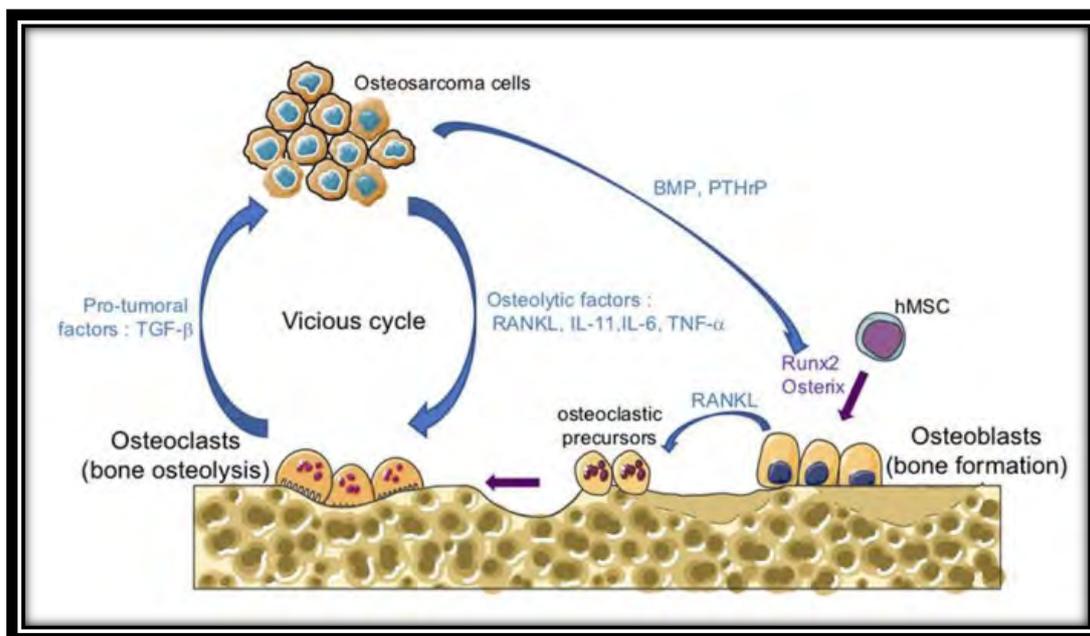


Figure 7 : Cercle vicieux établi entre les cellules tumorales et les cellules responsables du remodelage osseux au cours du développement des ostéosarcomes (Verrecchia and Rédini, 2018).

Pistes thérapeutiques :

Le rôle délétère des OCs dans le développement des ostéosarcomes a été mis en évidence dans des modèles murins en montrant que la prolifération des cellules ostéosarcomateuses primitives et la survenue de métastases étaient réduites en traitant les animaux par de l'acide zolédronique (ZA), inhibiteur puissant de la résorption ostéoclastique (60,61) (62–64). A la suite de ces résultats prometteurs (59), l'essai clinique de phase III (OS2006) a été ouvert en France en 2007, pour étudier l'impact de l'ajout de ZA aux thérapies conventionnelles (chirurgie et chimiothérapie) sur la survie des patients atteints d'ostéosarcomes. Malheureusement, l'étude a été stoppée en 2014 du fait de l'absence d'amélioration de la survie sur les analyses intermédiaires, plus mauvaise à 3 ans chez les patients traités par ZA (quel que soit l'âge des patients ou la réponse histologique) (44). Ces résultats négatifs ont par la suite été corroborés par une étude chinoise effectuée sur 798 patients atteints d'ostéosarcomes (69).

D'autres agents anti-ostéoclastiques, comme le Denosumab, anticorps dirigé contre RANKL, surtout utilisé pour le traitement des métastases osseuses, du myélome multiple ou des tumeurs à cellules géantes, ont donné des résultats prometteurs sur un cas d'OS vertébral inopérable en association avec du Sorafenib (Multi-Kinase Inhibiteur, MKI). Ce dernier fait l'objet d'une nouvelle étude en situation de récurrence tumorale (NCT02470091) (65). A l'inverse, plus récemment, il a été montré sur différentes lignées cellulaires (MG63 and U-2 OS) (66), que l'utilisation du Denosumab en association avec la doxorubicine était délétère, car induisait une inhibition de l'effet antitumoral de la doxorubicine. L'ensemble de ces données souligne la difficulté de transposer les résultats précliniques obtenus dans des modèles, chez l'homme.

3. Cellules Souches Mésenchymateuses

Les CSM de la moelle osseuse sont les cellules souches progénitrices pouvant se différencier soit en ostéoblastes soit en chondroblastes sous l'action de différents facteurs de transcription spécifiques (RUNX2, SP7...) (67). La différenciation des CSM en ostéoblastes matures implique une série complexe d'étapes de prolifération et de différenciation (68).

Les CSM sont les éléments clés du processus d'oncogénèse de l'ostéosarcome. Les controverses sur la nature de la cellule (CSM ou cellule déjà différenciée en ostéoblaste), à l'origine de l'ostéosarcome persistent, car la distinction entre les CSM qui ont le potentiel de se différencier en ostéoblastes dans un microenvironnement osseux spécifique, et les ostéoblastes qui sont les cellules précurseurs des cellules OS, est non résolue. Il a été clairement démontré dans différentes études, que différentes mutations génétiques comme la surexpression du gène c-MYC et une perte de Rb, dans des CSM humaines étaient associées à la tumorigénèse de l'OS (69), et que le stade de différenciation des CSM (70), la source tissulaire des CSM (70) et les modifications du microenvironnement osseux à des stades spécifiques de différenciation pouvaient influencer la transformation maligne des CSM en cellules ostéosarcomateuses (71). Ainsi, il est préférable d'attribuer l'origine cellulaire de l'OS à « une population de CSM » soumise à un stress oncogène spécifique, à un stade de différenciation spécifique.

Les CSM ont différentes propriétés et vont interagir avec les autres acteurs du TME pour favoriser la sécrétion de cytokines et activer différentes voies de signalisation responsables de la prolifération et du processus métastatique de l'ostéosarcome.

Au contact des cellules tumorales, les CSM peuvent se différencier en « Fibroblastes associées aux cancers » (CAFs). Les CAFs ont une grande influence sur la composition du TME et la composition de la matrice extracellulaire (MEC) qu'ils produisent. La MEC, en constituant l'architecture du TME est impliquée dans les communications intercellulaires, l'adhésion cellulaire et par voie de conséquence, via ses modifications, contribue à l'initiation, la progression, et la dissémination métastatique des cellules ostéosarcomateuses (72). La MEC représente ainsi une nouvelle cible thérapeutique (73).

Les CSM possèdent des fonctions pro-inflammatoires mais également immunomodulatrices. Dans le TME, les CSM vont adopter un phénotype immunomodulateur pour façonner un environnement favorable au développement tumoral (74). Les CSM favorisent la libération de cytokines et de chimiokines. Les cytokines et les chimiokines, telles que le facteur de croissance

transformant (TGF)- β , le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α et l'interféron- γ jouent un rôle crucial dans l'ontogénie tumorale. Les chimiokines dérivées des BMSC (CXCL1, CXCL2 ou CXCL12), favorisent la prolifération du cancer en se liant aux récepteurs CXCR2 et CXCR4. CXCL12, en se liant à CXCR4 et CXCR7, régule la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation, la survenue de métastases cancéreuses dans l'ostéosarcome et sont associées à une mauvaise survie globale. Han et al ont montré que l'invasion des cellules ostéosarcoma-teuses était nettement augmentée dans un système de co-culture BMSC/cellules OS (LM8) en présence de CXCL12/CXCR4, et que l'invasion n'était pas contrôlée en utilisant un inhibiteur spécifique de CXCR4 (AMD3100), du fait d'une compensation par une surexpression de CXCR7, ouvrant des perspectives thérapeutiques en agissant via les CSM, sur la régulation des interactions entre CXCR4 et CXCR7 (75).

Les CSM peuvent aussi favoriser la progression, le développement tumoral et la résistance aux traitements tels que la chimiothérapie et la radiothérapie, en activant l'expression des gènes liés à l'hypoxie comme le facteur 1 inductible par l'hypoxie (HIF-1). Ce dernier est responsable d'une adaptation cellulaire et de l'angiogénèse hypoxique péri-tumorale via l'activation de gènes cibles (VEGF et GLUT1).

Comme précédemment décrit, les CSM jouent ainsi un rôle majeur dans la communication entre les cellules tumorales et leur microenvironnement (CAFs, cytokines, chimiokines...) (76).

Cette communication se fait principalement par la sécrétion et l'absorption de vésicules extra-cellulaires (VE) par les cellules tumorales mais également par les CSM (Figure 8). Les VE sont des vésicules à l'échelle nanométrique (exosomes et microvésicules) dont le rôle est central dans le développement, la progression, le processus métastatique de l'ostéosarcome et la résistance aux traitements. En fonction du milieu dans lequel les VE sont exposées, elles vont libérer des acides nucléiques (ADN, ARNm et miARN), des protéines, des métabolites et des lipides (77).

L'activation des voies de signalisation (Akt, STAT3) stimulées par la sécrétion de cytokines régulatrices (TGF-B, IL-6, VEGF, HIF-1) dans le TME va favoriser la croissance tumorale et la dissémination métastatique (78,79). Les miARN présents dans les VE facilitent aussi le développement tumoral en régulant l'expression de gènes cibles au niveau post-transcriptionnel (80).

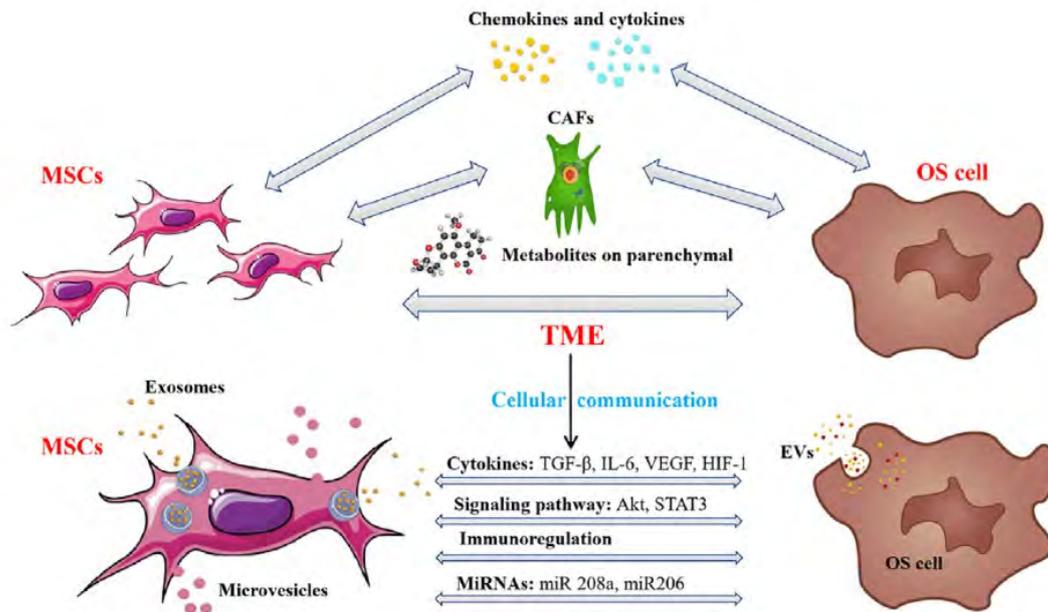


Figure 8 : Effets des cellules souches mésenchymateuse (CSM) sur les cellules d'ostéosarcome (OS) et la communication cellulaire (Xingyu Chang et Al, New perspective into mesenchymal stem cells: Molecular mechanisms regulating osteosarcoma, Journal of Bone Oncology 2021)

Pistes thérapeutiques :

Les CSM, du fait de leur caractéristiques uniques (propriété d'homing, cellules multipotentes dotées de VE), peuvent être modifiées et transformées en vecteurs biologiques, chargées de médicaments ou de gènes anticancéreux, et transfectées pour traiter de façon ciblée les cellules tumorales ostéosarcomateuses.

Des thérapeutiques basées sur la capacité migratoire des CSM sur le site tumoral et les nouvelles thérapeutiques ciblant la triade RANKL/RANK/OPG sont actuellement en développement.

Qiao et Al (81) ont montré que des CSM transfectées avec un adénovirus du gène OPG (MSC-OPG) pouvaient migrer vers le TME et exprimer la protéine OPG ayant comme effet d'inhiber la destruction osseuse et réduire la croissance tumorale.

Des molécules capables de bloquer l'activité paracrine des CSM pro-oncogènes (aussi appelées CSM-éduquées par la tumeur) ont été développées, et sont à l'étude. Elles pourraient ralentir la progression tumorale (82). Le ciblage des CSM d'origine adipeuse (AD-CSM), favorable à la progression des cellules ostéosarcomateuses est aussi une piste thérapeutique intéressante pour empêcher la progression tumorale.

D'autres traitements ciblant les VE sécrétées par les CSM sont aussi en voie d'exploration (83). En effet, l'utilisation des CSM, même si prometteuse, doit être optimisée car peut être toxique ou inefficace du fait d'une cinétique de libération variable du médicament. L'utilisation des CSM-exos, c'est-à-dire des exosomes dérivées de CSM offrent de nouvelles perspectives, du

fait de leur isolement et stockage, plus simples, et de leurs propriétés : faible volume, moindre immunogénicité. Qin F et al ont montré que les exosomes issus des CSM osseux (BMSC-Exos) pouvaient en transportant miR-208 induire la migration, la survie et la capacité de clonage des cellules ostéosarcomateuses (84). A l'inverse, les BMSC-Exos en transportant miR-206 peuvent inhiber la prolifération, la migration et l'invasion des cellules ostéosarcomateuses, en induisant leur apoptose.

4. Angiogenèse

La néo-angiogenèse est essentielle à la croissance tumorale et à sa dissémination métastatique, par l'apport de nutriments et d'oxygène, et en favorisant l'intra-/extravasation de cellules cancéreuses. Le réseau vasculaire tumoral utilise des moyens physiologiques pour se développer mais également d'autres mécanismes plus spécifiques des tumeurs tel que la vasculogénèse ou le mimétisme vasculaire (85). Les OS sont des tumeurs osseuses richement vascularisées qui se développent dans un microenvironnement hypoxique et acide propice à une angiogenèse tumorale par la sécrétion de facteurs de croissance angiogènes conduisant à un déséquilibre de la balance pro-/anti-angiogénique. L'hypoxie provoque l'expression de l'HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) formant un facteur de transcription actif du VEGF. Le VEGF (vascular endothelial growth factor) est le principal facteur stimulant l'angiogenèse. Il favorise la croissance des cellules endothéliales, la maturation et la formation de nouveaux vaisseaux en interagissant avec son récepteur transmembranaire (VEGFR) sur les cellules endothéliales (86). L'expression du VEGF est corrélée au niveau d'angiogenèse et permet d'évaluer l'importance pronostique de l'angiogenèse dans les OS. L'expression du VEGF-A (par immunohistochimie) dans les ostéosarcomes a été associée à un risque plus élevé de métastases pulmonaires et à une survie plus faible (87). En outre, il a été démontré que l'amplification du gène VEGFA était un facteur de mauvais pronostic pour la survie sans récurrence. Ces résultats ont suscité un intérêt pour les médicaments ciblant la voie du VEGF afin d'améliorer le pronostic des OS. Paradoxalement, l'expression de VEGF augmente la densité en micro vaisseaux et peut contribuer à la pénétration des chimiothérapies dans la niche tumorale lors de la chimiothérapie néo adjuvante, d'où l'association du VEGF avec une bonne réponse à la chimiothérapie dans les OS (88).

Pistes thérapeutiques :

L'angiogenèse apparaît comme une cible thérapeutique intéressante pour l'OS pouvant être touchée à différents niveaux pour limiter la croissance et la dissémination de la tumeur. Plusieurs inhibiteurs de la voie de signalisation du VEGF ont été développés comme un anticorps

spécifique du VEGF A, le bévécizumab, qui prévient l'interaction entre le VEGF et ses récepteurs VEGFR1 et 2, limitant ainsi l'initiation de l'angiogenèse. Néanmoins, un essai de phase II associant le bévécizumab et la chimiothérapie classique chez des patients atteints d'OS localisés n'a pas mis évidence d'amélioration de la réponse histologique ni la survie sans événement (89). Les essais cliniques les plus prometteurs ont été ceux incluant des agents anti-angiogéniques ciblant les VEGFR, comme le sorafenib seul ou associé à l'everolimus, un inhibiteur de mTOR2 (90). Ces essais publiés par l'Italian Sarcoma Group dans les cas d'OS récidivant ont montré une augmentation de la survie sans progression de 4 à 6 mois pour 43 à 46 % des patients.

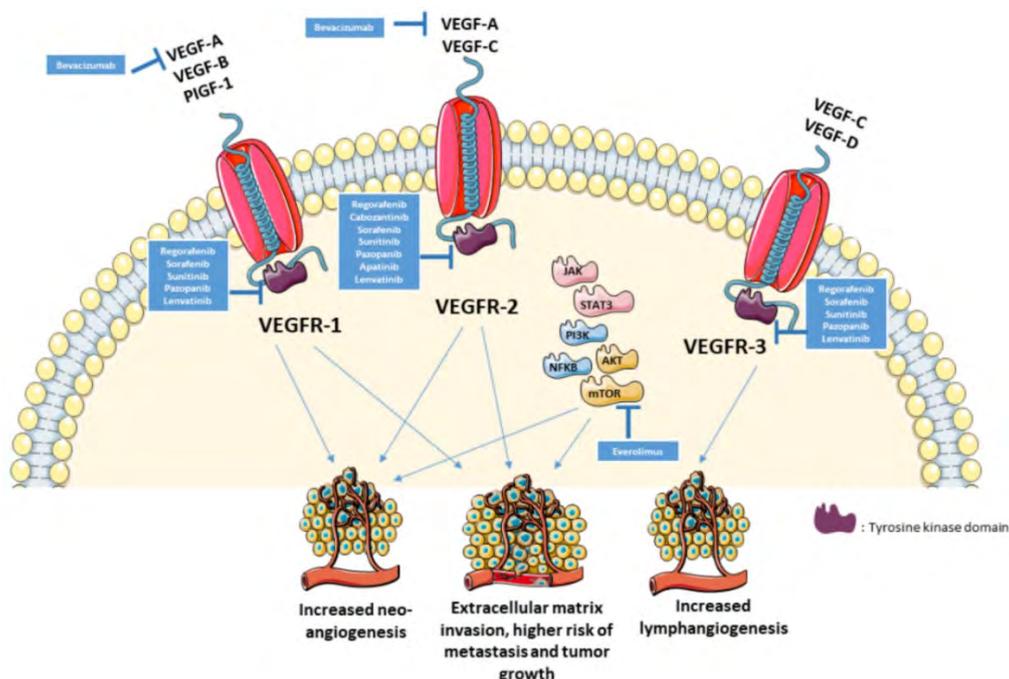


Figure 9 : Les différentes voies du VEGF dans l'ostéosarcome et cibles thérapeutiques potentielles (Assi et Al. Targeting the VEGF Pathway in Osteosarcoma. *Cells*. 2021)

5. Cellules immunitaires

Le TME immunitaire dans la plupart des sarcomes est très hétérogène, composé essentiellement des macrophages associés aux tumeurs (TAMs) (55,91), de cellules dendritiques, de cellules myéloïdes, d'OCs et de lymphocytes T/B. Les cellules tumorales sont capables de moduler le recrutement, la prolifération et la différenciation de ces cellules immunitaires afin de permettre la mise en place d'une immunosuppression locale, plus propice au développement tumoral (92).

a. Lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs) :

Les TILs représentent la deuxième plus grande population cellulaire du paysage immunitaire des sarcomes osseux après les TAMs (93).

Les TILs sont des lymphocytes T présentant une spécificité immunologique plus élevée contre les cellules tumorales par rapport aux lymphocytes non infiltrants la tumeur (94). Ils ont la capacité de reconnaître et de détruire les cellules présentatrices d'antigènes tumoraux (CPA) en tant que lymphocytes T cytotoxiques CD8+, et peuvent réguler la réponse immunitaire en tant que lymphocytes T auxiliaires CD4+. Les cellules tumorales peuvent inhiber ces fonctions par la sécrétion de molécules immunosuppressives et par l'activation de check points immunitaires dont les plus connus sont CTLA-4 et PD-1 (94,95). La liaison de PDL-1, exprimé par les cellules tumorales, sur les lymphocytes T inhibe leurs activités cytotoxiques et contribue donc au développement d'un microenvironnement immunosuppresseur au contact de la tumeur. Des études ont rapporté qu'une faible quantité de lymphocytes T CD8+ sur les biopsies initiales semblait être associée à une augmentation des métastases de l'OS (55,96). Des méta-analyses ont montré une association significative entre l'expression de PDL-1 dans les échantillons tumoraux avec la survie globale des patients et le risque de métastases dans les sarcomes osseux (97,98). D'autres études ont montré que les OS n'exprimaient que très peu PD-1/PDL-1 (55,99,100), limitant l'effet thérapeutique des immunothérapies.

Pistes thérapeutiques :

Le développement récent d'inhibiteurs des checkpoints immunitaires a fait l'objet d'études dans les ostéosarcomes dans des essais de phase I et II.

L'essai clinique de phase II SARC028 (NCT02301039) a testé l'efficacité du pembrolizumab (MK3475), un anticorps ciblant le récepteur PD-1 exprimé par les lymphocytes T, chez des patients atteints de sarcomes des tissus mous ou du tissu osseux avancés. Les premiers résultats sont peu concluant pour les ostéosarcomes puisque seul un patient (1/22) présentait une réduction de plus de 30% de la lésion tumorale observée (101). L'essai clinique français de phase II PEMBROSARC (NCT02406781) a confirmé que l'inhibition de PD-1 ne semblait pas efficace pour les patients atteints d'ostéosarcome (102).

Dans un essai clinique de phase I sur des tumeurs solides pédiatriques de stade avancé, 6 des 33 patients ont vu leur progression stabilisée par l'ipilimumab (anti-CTLA4), dont 2 (25%) des 8 patients atteints d'OS avec des effets immunitaires indésirables acceptables (103).

Une étude a montré que l'expression de PD-1 sur les TILs CD8+ était significativement diminuée après l'utilisation d'un anticorps anti-PD-L1 chez des souris atteintes d'un cancer du sein métastatique, mais que l'expression de CTLA-4 était augmentée, suggérant que PD-L1 et

CTLA-4 pourraient avoir un effet complémentaire dans la suppression des réponses immunitaires médiées par les lymphocytes T cytotoxiques (104) et encouragent à utiliser des stratégies thérapeutiques combinées. Blattman et al. ont rapporté que l'utilisation du blocage des anticorps α -CTLA-4 et α -PD-L1 entraînait un contrôle complet de l'OS métastatique et la prévention de l'échappement immunitaire de l'OS chez la moitié des souris traitées (105). Des essais portant sur le blocage des checkpoints immunitaires combiné à une chimiothérapie adjuvante et néo-adjuvante ou à une thérapie ciblée dans les OS sont en cours, tels que camrelizumab associé à l'apatinib (NCT03359018) et pembrolizumab associé à l'axitinib (106).

b. Macrophages associés aux tumeurs (TAMs) :

Précédemment, nous avons montré, comme d'autres équipes, qu'à l'échelle tissulaire, le TME des OS était riche en TAMs et en OCs, et pauvre en lymphocytes CD8⁺ cytotoxiques, renforçant l'idée que les cellules tumorales favorisent un microenvironnement immunosuppresseur, les rendant résistantes aux checkpoints inhibiteurs (55,107–109) (110)(111). Le TME de l'OS est complexe à étudier en raison de l'implication supplémentaire, aux cellules habituelles du TME, de cellules du remodelage osseux, comme les OCs impliqués dans la résorption osseuse (112), et issus de la différenciation des monocytes/macrophages sous l'influence de facteurs de stimulation macrophagiques (CSF-1 ou M-CSF) et de RANKL (113). Cette complexité est renforcée par le fait que l'on ne dispose pas de marqueurs spécifiques distinctifs des différentes populations macrophagiques et des OCs. Classiquement, les TAMs sont divisés en deux sous-types, M1 et M2, en fonction de leur polarisation. Les macrophages polarisés M1 sont définis comme ayant une activité pro-inflammatoire anti-tumorale tandis que les macrophages polarisés M2 comme ayant une activité anti-inflammatoire pro-tumorale (107,114), avec une capacité pour ces 2 sous types, de switcher d'une polarisation à l'autre en fonction de différents facteurs mécaniques, vasculaires, et cellulaires (115). Dans différents modèles in vitro et in vivo, il est observé que le phénotype M2 va favoriser la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et contribuer à la progression tumorale et à la dissémination métastatique (116,117). Chez la souris, l'équipe de Cheng et al. ont très récemment démontré, que les exosomes provenant des cellules ostéosarcomateuses, induisaient la polarisation M2 des macrophages et favorisaient l'invasion et les métastases par l'intermédiaire de Tim-3 (118).

Différentes études in vivo et chez l'homme, ont montré que les OCs étaient associés à un plus mauvais pronostic (55,107–109), et que certains sous types de macrophages étaient associés à un meilleur pronostic dans les OS (55). Les marqueurs les plus fréquents, utilisés pour caractériser les macrophages M1 et/ou M2, sont le CD68, plutôt considéré comme un marqueur pan-macrophages ou comme un marqueur des macrophages polarisés M1, mais qui marque aussi

les OCs (119), et le CD163 plutôt considéré comme marqueur macrophagique de polarisation M2 (120). Grâce à l'analyse immunohistochimique des populations macrophagiques et ostéoclastiques des biopsies de patients inclus dans des TMA de l'essai clinique OS 2006, et de l'analyse du profil évolutif de cytokines inflammatoires associées à la lignée myéloïde (CSF-1R et TRAP), dosées dans le sérum de ces mêmes patients, nous avons donné une explication à la résistance de l'OS au traitement par le Zometa, biphosphonate à activité anti-ostéoclastique. Nous avons confirmé que les OCs étaient associés à un plus mauvais pronostic et avons démontré que dans le groupe de patients avec un haut niveau de TRAP (marqueur de l'activité ostéoclastique) au diagnostic, c'est-à-dire dans des tumeurs très ostéolytiques, il existait une meilleure réponse au traitement par chimiothérapie. Malheureusement sur l'ensemble de la cohorte, nous avons montré que l'action bénéfique du Zometa était contrebalancé par un effet délétère sur certaines populations macrophagiques protectrices marquées CD163.

Par une approche en immunohistochimie multiplexe, sur la collection OS de l'IUCT (OSNew), nous avons observé que la répartition des populations macrophagiques différait en fonction de la production osseuse tumorale. Ainsi, les macrophages CD163+/CD68- étaient surtout localisés dans les territoires ostéoformateurs, et les ostéoclastes matures CD163-/CD68+, surtout présents dans des territoires cellulaires (ostéolytiques). De plus nous avons identifié une population de cellules de la lignée macrophagique, co-marquée CD163+/CD68+ de distribution homogène et de polarisation indéfinie au sein des territoires tumoraux, avec un rôle vraisemblablement déterminant en fonction des interactions cellulaires et des contraintes mécaniques et vasculaires, dans le statut évolutif et la réponse aux traitements (121).

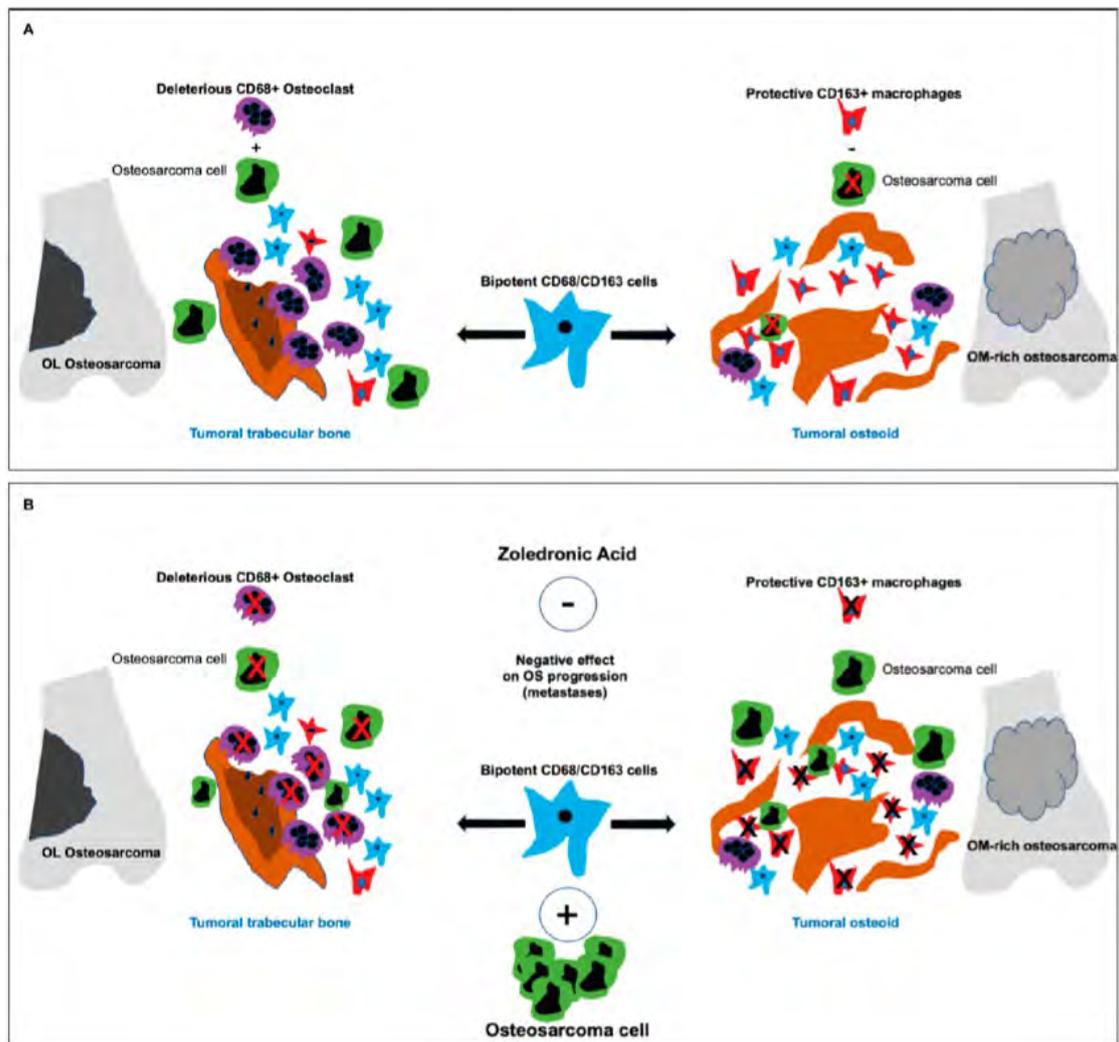


Figure 10 : (A) Le déséquilibre des ostéoclastes, des macrophages et des cellules bipotentes impliqués dans le remodelage osseux tumoral dans l'ostéosarcome (B) Effet inhibiteur de l'acide zoledronique (ZA) sur les ostéoclastes CD68+/CD163- délétères et les macrophages (Gomez-Brouchet et Al, 2021).

Récemment, le séquençage d'ARN unicellulaire (scRNA-seq) s'est révélé prometteur dans l'exploration de l'hétérogénéité intra-tumorale d'une variété de cancers, et dans l'étude des interactions cellulaires entre cellules tumorales et microenvironnement tumoral (30). L'étude traditionnelle du transcriptome « transcriptome bulk », effectuée sur des échantillons tissulaires tumoraux est basée sur le mélange des populations cellulaires, ce qui ne permet pas d'identifier spécifiquement les différents types cellulaires et de caractériser précisément la complexité de l'hétérogénéité intratumorale des tumeurs. Les nouvelles techniques de séquençage de l'ARN en cellule unique (scRNA-seq) permettent de dépasser ces limites et de cartographier un tissu au niveau cellulaire, en mesurant l'expression des gènes dans chaque cellule de l'échantillon. Cette technologie permet d'estimer le phénotype de chaque cellule d'un échantillon, et d'estimer le niveau de différenciation de chaque cellule au sein d'un tissu, et par conséquent la dynamique du processus de différenciation cellulaire.

Cette approche en scRNAseq a été réalisée récemment pour la première fois par Zhou et collaborateurs sur 11 cas d'ostéosarcomes (7 tumeurs primitives, 2 tumeurs récidivantes et 2 tumeurs métastatiques) pour explorer les caractéristiques transcriptomiques des cellules tumorales et de leur microenvironnement (121).

La caractérisation du microenvironnement immunitaire par cette approche en scRNAseq a permis de confirmer les données de la littérature et d'observer la prédominance des cellules myéloïdes dans le TME de l'OS avec des activités stimulatrices et inhibitrices du développement tumoral. L'étude des profils d'expression a permis de montrer l'existence de connections étroites entre macrophages et cellules NK, cellules T et Cellules Dendritiques, et de confirmer la dynamique de transformation des macrophages M1 et M2 entre eux. Une action pro-inflammatoire des macrophages alvéolaires, les FABP4+ TAMs, a également été observée dans les métastases pulmonaires. De même, les OCs sont différenciés en 3 sous-groupes (progéniteurs, immatures et matures) avec une transition progressive au cours de la maturation, de l'expression des gènes associés à la présentation antigénique, à celle des gènes associés à la résorption osseuse et au remodelage, renforçant nos hypothèses sur leur rôle complexe dans la dynamique évolutive de l'OS. L'étude des profils d'expression de différents sous-groupes de TILs, quant à eux, (CD4⁻ CD8⁻ T, CD8⁺ T, CD4⁺ T, T-reg, cellules T proliférantes, cellules T NK, NK, CXCL13⁺, cellules B), a montré une plus forte expression des récepteurs inhibiteurs de l'épuisement des lymphocytes T, comme TIGIT (T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains) au niveau des CD8, CD4, T-reg, et NK offrant de nouvelles perspectives thérapeutiques par des inhibiteurs du récepteur TIGIT.

Au niveau des cellules tumorales, l'analyse évolutive des profils transcriptomiques a laissé suggérer que le phénotype ostéoblastique est plus agressif, et résulte d'une transdifférenciation du phénotype chondroblastique.

Ces data extrêmement récentes associées à nos précédents travaux étayent encore plus l'hypothèse selon laquelle la réponse à la chimiothérapie et le pronostic des patients sont fortement dépendants de la composition cellulaire de la tumeur et de son microenvironnement.

Pistes thérapeutiques :

Le mifamurtide (muramyl tripeptide phosphatidyléthanolamine liposomale, L-MTP-PE) est un composé immunostimulant qui active les macrophages et les monocytes en sécrétant du TNF α et de l'IL-6 (122). Un essai clinique de phase III a montré que les patients atteints d'OS présentaient une meilleure survie lorsque le mifamurtide était associé à la chimiothérapie adjuvante de l'OS chez les patients non métastatiques (survie à 6 ans de 78% contre 70%) (123). Une autre étude a montré une tendance à l'amélioration de la survie chez les patients métastatiques

suivant le même protocole thérapeutique (124). Cependant, la possibilité d'une interaction entre le mifamurtide et l'ifosfamide n'a pas pu être exclue, ce qui a conduit de nombreuses personnes à s'interroger sur l'effet réel du L-MTP-PE sur les résultats obtenus chez les patients atteints d'OS (125). Par conséquent, le mifamurtide n'a pas encore été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) et son utilisation n'est autorisée que dans quelques pays européens. Pour déterminer si l'ajout du mifamurtide à la chimiothérapie postopératoire était plus efficace que la chimiothérapie seule dans les ostéosarcomes à haut risque (39), un essai de phase II Français SARCOMÉ13 est en cours de réalisation.

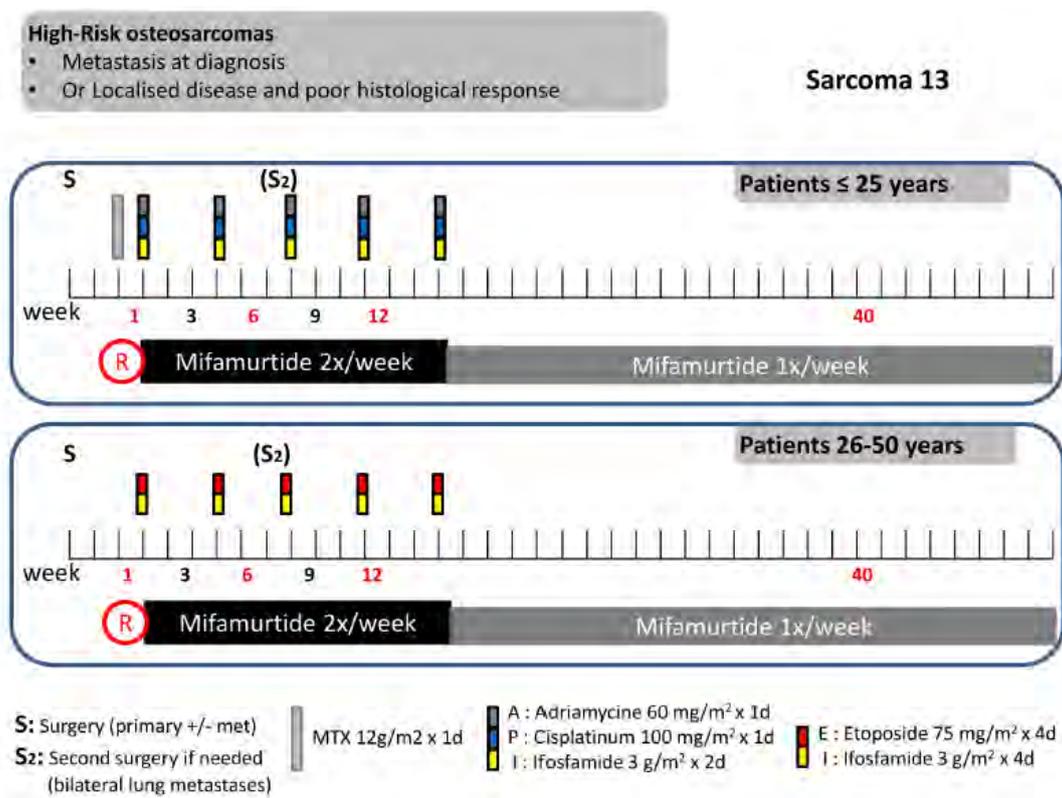


Figure 11 : Protocole de traitement dans l'essai Sarcoma13/OS2016, en fonction de l'âge chez des patients avec OS à haut- risque (métastatique ou mauvais répondeurs à la chimiothérapie). (Brard et al., 2019)

Si les résultats obtenus par notre groupe se confirment (121), sur des cohortes plus importantes, et si l'étude SARCOMÉ 13 confirme que le mifamurtide améliore la survie des patients atteints d'ostéosarcomes, on pourrait proposer un algorithme thérapeutique centré sur la proportion des cellules du microenvironnement présentes au diagnostic : les tumeurs plutôt ostéolytiques (riches en ostéoclastes CD68+) traitées par un anti ostéoclastique comme le ZA ou le Denosumab en association ou pas du mifamurtide et les tumeurs riches en matrice osseuse tumorale, avec un haut taux de CD163 traitées par mifamurtide. En fonction du nombre de cellules CD8+, un traitement combiné par immunothérapie pourrait aussi être discuté.

C. Etude du microenvironnement osseux et de la réponse à la chimiothérapie par techniques d'imagerie standard et de dernière génération : à l'ère de l'intelligence artificielle

L'imagerie, qui est effectuée avant toute intervention, joue un rôle crucial dans le diagnostic, l'évaluation du stade de la tumeur, le suivi de la réponse au traitement et la surveillance de la récurrence. Le compte rendu radiologique est la pierre angulaire de la communication entre la radiologie et l'équipe pluridisciplinaire. Par conséquent, il doit être standardisé, doit décrire les principaux éléments qui aident à planifier un traitement ultérieur, doit indiquer l'étiologie présumée, et fournir un diagnostic différentiel en cas de résultats équivoques.

Les principaux objectifs de l'imagerie sont de déterminer la taille, l'extension centromédullaire de la tumeur, le degré d'infiltration du cartilage de conjugaison, des articulations, des tissus mous, des éléments vasculo-nerveux, les skips métastases, afin de planifier le meilleur site biopsique, la résection chirurgicale, l'envahissement des ganglions loco-régionaux. L'utilisation et la sélection appropriée de diverses techniques d'imagerie dans le bilan diagnostique d'un patient atteint d'un sarcome osseux primitif sont essentielles pour un diagnostic et un traitement adapté. Une lésion ostéolytique ou ostéoblastique associée à une réaction périostée agressive, l'élaboration d'une matrice osseuse, la prise de contraste hétérogène sont les principales caractéristiques évocatrices d'une tumeur maligne osseuse en imagerie.

De nos jours, il existe de nombreuses technologies non invasives, la TDM, l'IRM et l'imagerie nucléaire pour étayer un diagnostic. En fonction de l'âge du patient, de la localisation de la tumeur, et de critères radiologiques plusieurs diagnostics différentiels peuvent être évoqués.

1. Les techniques standard

a. Radiographie standard

Les OS peuvent être très hétérogènes dans leur présentation radiologique. Ils sont ostéocondensants (OCD) (45 %), ostéolytiques (OL) (30 %) ou mixtes (25 %) selon le degré de minéralisation de la matrice (126). L'ostéocondensation, typiquement de type « nuageux », peut être observée dans l'os et les parties molles en regard. L'ostéolyse est dite « mitée » lorsque la lésion est lytique. On rencontre fréquemment une destruction corticale et des appositions périostées qui peuvent être de plusieurs types : en « feu d'herbe » (spicules longs, fins et divergents), en « poil de brosse » (spicules perpendiculaires à la corticale), rarement lamellaires. L'éperon ou triangle de Codman (Figure 12) correspond à la surélévation du périoste, interrompu par la tumeur qui s'étend dans les parties molles.

Les caractéristiques de la radiographie standard permettent de différencier les tumeurs osseuses indolentes, des tumeurs osseuses agressives.

b. Tomodensitométrie

La TDM reste la méthode standard dans l'analyse des lésions de la colonne vertébrale et du bassin. Elle est d'une grande sensibilité pour étudier les calcifications, ossifications, la minéralisation de la matrice osseuse tumorale, analyser le degré de destruction osseuse de l'os spongieux et de la corticale, et la réaction périostée (Figure 13). Elle donne une meilleure estimation de la profondeur et du degré de festonnage endo-osseux. La TDM ne permet pas une évaluation de l'invasion pilaire et de l'extension locorégionale aussi fiable que l'IRM. Un TDM thoracique sera fait systématiquement à la recherche de localisations secondaires déjà présentes chez 20% des patients au diagnostic (50% étant de localisation pulmonaire).



Figure 13 : Radiographie OS mixte avec minéralisation prédominante dans les tissus mous (éperon de Codman : flèche)

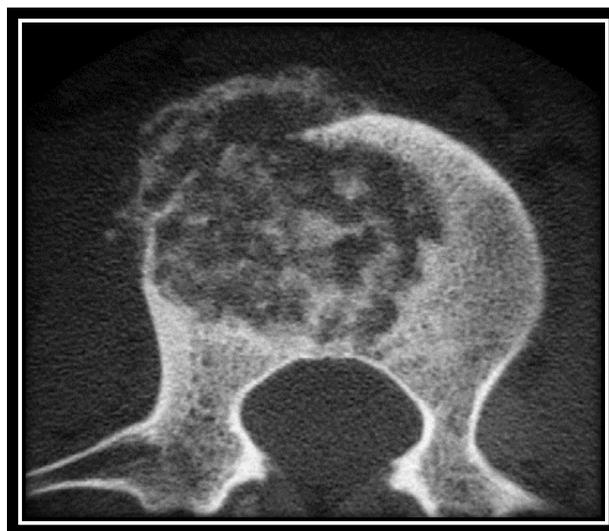


Figure 12 : TDM montrant la minéralisation de la matrice tumorale, la condensation du corps vertébral et l'extension dans les tissus mous pré vertébraux.

c. Imagerie par résonance magnétique

L'IRM classique (IRMc) est le meilleur examen pour apprécier l'extension tumorale intra et extra médullaire, et évaluer le stade tumoral selon le système UICC/AJCC. L'IRMc sera faite de préférence avant la biopsie afin d'éviter les remaniements hémorragiques et œdémateux post-biopsiques, qui peuvent rendre l'interprétation difficile. Si l'on ne dispose pas de TDM, les images IRM devront être évaluées en combinaison avec des radiographies récentes, qui permettent de mieux voir la réaction périostée et donc le degré d'agressivité de la tumeur. Le champ

d'exploration de l'IRM doit permettre l'analyse de l'os dans son ensemble et des deux articulations adjacentes afin de rechercher les skip métastases, définies comme des localisations tumorales situées dans le même os et séparées de la lésion principale par de l'os sain ou présentes sur un autre segment osseux trans-articulaire (127) (Figure 14).

La séquence écho spin T1 sans injection de produit de contraste est essentielle pour déterminer avec précision l'étendue d'une tumeur avant la chirurgie. Gulia et al. ont démontré qu'il existait une forte corrélation pour toutes les tumeurs osseuses étudiées (OS, Sarcome d'Ewing, Chondrosarcome), entre la taille tumorale déterminée histopathologiquement après résection et la taille tumorale estimée par l'IRM en préopératoire (128). L'injection de Gadolinium permettra de mieux identifier les zones tumorales solides, les zones de nécrose, d'hémorragie (nécessaire à la planification de la biopsie) et l'atteinte articulaire. Dans notre département de radiologie, s'il n'existe aucune contre-indication, nous réalisons deux plans de coupe avec systématiquement le plan axial, et des séquences d'écho de spin T1 et T2 Fat Sat et des séquences d'écho de spin T1 Fat Sat après injection intraveineuse de gadolinium.

L'IRM permet également de sélectionner un site propice pour une biopsie de bonne qualité. Crombé et al. et Zaho et al., ont montré que l'hétérogénéité tumorale, la quantité de nécrose et du rehaussement péri-tumoral par l'IRM étaient des critères prédictifs indépendants du grade tumoral, et étaient associés aux tumeurs de haut grade (129,130). Ainsi, en ayant une spécificité plus élevée dans la représentation de l'hétérogénéité tissulaire, l'IRM aide mieux à guider le site de biopsie.

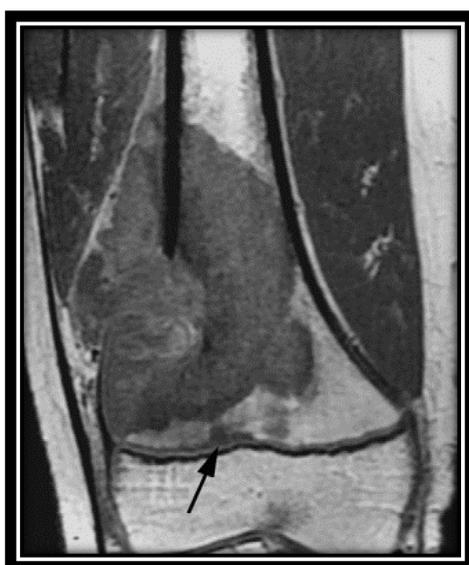


Figure 14 : OS de l'extrémité distale du fémur en pondération T1.

Notez l'extension dans les parties molles, la présence d'une skip métastase du versant métaphysaire du cartilage de croissance et le caractère net de l'infiltration tumorale dans la moelle osseuse.

2. Nouvelles techniques d'IRM

Les techniques d'imagerie évoluent rapidement pour répondre à des schémas thérapeutiques nouveaux et personnalisés. En dehors des séquences d'IRM conventionnelles (IRMc), d'autres techniques d'IRM de dernière génération, notamment l'IRM de diffusion (IRM-DWI), l'IRM dynamique avec injection de produit de contraste (IRM-DCE), la spectroscopie IRM (MRS), sont en cours d'évaluation pour étudier les sarcomes osseux. Ces techniques d'imagerie nouvelles ne sont pas accessibles partout, et leurs intérêts exacts doivent encore être établis dans le diagnostic et l'évaluation des traitements des tumeurs osseuses. Ci-dessous sont décrits les intérêts diagnostiques de ces différentes IRM. L'évaluation radiologique de la réponse au traitement sur différentes cibles/Non cibles tumorales, repose sur les Critères RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors).

Tableau 3 : Résumé des différentes techniques IRM de nouvelle génération

Séquences FAST SPIN Echo T1	<ul style="list-style-type: none"> - Caractérisation des zones pathologiques et saines (tumeur et structures environnantes) - Etude de la Moelle Osseuse - Caractérisation des lésions adipeuses
Séquences FAST SPIN Echo T2	<ul style="list-style-type: none"> - Séquences idéales pour analyser la structure de la masse, son caractère homogène ou hétérogène, ses limites, ses dimensions et ses rapports. - Signal hétérogène = ++ Tumeur maligne - Faible signal T2 = tissu fibreux, calcifications, ossifications ou dépôts d'hémosidérine - Niveaux liquides
Suppression de la graisse (Fat suppression)	<ul style="list-style-type: none"> - Dépistage des faibles hypersignaux, œdème et anomalie médullaire
Séquence STIR (Short T1 Inversion Recovery)	<ul style="list-style-type: none"> - Excellent contraste entre tissus sains et tumoraux ; mais définition spatiale médiocre, accentuation des artefacts de mouvements, - Surestimation de l'extension tumorale
Séquences en Echo de gradient	<ul style="list-style-type: none"> Utilisées dans la recherche d'artefact de susceptibilité magnétique induits par des dépôts d'hémosidérine, une hémorragie, de l'air ou des fragments métalliques
Séquences après injection de Gadolinium	<ul style="list-style-type: none"> - Renseignent sur la vascularisation, l'architecture des vaisseaux dans la tumeur, les vaisseaux efférents et afférents (une néogénèse anarchique et un envahissement des vaisseaux feront évoquer une TM). - Différenciation tumeurs solides/kystes et hématome - Mise en évidence de la nécrose spontanée ou après traitement - Différenciation œdème de cellules viables

IRM Dynamique, après injection de produit de contraste (IRM-DCE)	<ul style="list-style-type: none"> - Différenciation zone tumorale active avec néovascularisation (prise rapide du produit de contraste) de la zone oedémateuse (prise de contraste plus tardive) - Différenciation de la nécrose - Différenciation tissu tumoral viable actif versus nécrose pour guider la biopsie - étude de la réponse à la radiothérapie ou chimiothérapie - Information de la perfusion des tissus, de la vascularisation, perméabilité capillaire, volume des espaces interstitiels - Monitoring de la réponse à la chimiothérapie (après le début du traitement par chimiothérapie, pendant la surveillance après la chirurgie)
IRM de diffusion (IRM-DWI)	<ul style="list-style-type: none"> - Évaluation qualitative et quantitative de la cellularité tissulaire et de l'intégrité membranaire - Restriction de la diffusion dans les tumeurs malignes : différenciation TB/TM => Écueil abcès - Évaluation de la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante (maladie résiduelle, récurrence, tissu de granulation, fibrose...) - réponse aux traitements
La spectrométrie IRM	<ul style="list-style-type: none"> - Domaine de la recherche - Élévation du taux de choline dans les TM - Différenciation TB/TM

L'IRM Dynamique après injection de produit de contraste (IRM-DCE), en permettant l'analyse dans le temps de la prise de contraste (pente) et la perfusion de la tumeur (chasse du produit de contraste) est l'examen de choix pour fournir des informations sur les propriétés vasculaires du tissu en distinguant différents patterns de rehaussement du produit de contraste. En pratique, l'importance du rehaussement du signal de la tumeur ne permet pas de différencier les TB des TM, même si en général les TM présentent une néovascularisation importante, et un rehaussement du signal plus intense et rapide que les formations bénignes. L'IRM dynamique permet de mesurer quantitativement non seulement la perfusion tumorale, mais également d'autres paramètres micro-vasculaires tels que la perméabilité des vaisseaux et les fractions volumiques. Enfin, L'IRM-DCE permet de différencier un tissu tumoral viable de rehaussement rapide d'une nécrose, où il n'y a pas de rehaussement, des modifications post-thérapeutiques tardives, un œdème péri-tumoral ou un tissu de granulation.

L'imagerie de diffusion (IRM- DWI) est une technique IRM dont le contraste est déterminé par les mouvements des molécules d'eau au sein du parenchyme. Ces mouvements sont caractérisés par le coefficient de diffusion apparent appelé ADC (apparent coefficient diffusion). L'imagerie de diffusion, permet de façon non invasive, une caractérisation tissulaire. En étudiant la mobilité des molécules d'eau, l'IRM de diffusion étudie de façon indirecte la quantité de barrières à la diffusion : membranes cellulaires, macromolécules. Ceci explique par exemple qu'au sein d'un tissu très cellulaire, la multiplication du nombre de barrières aboutit à une restriction de la diffusion qui se traduit par une augmentation du signal. En pratique, la majorité des pathologies (tumorales, inflammatoires) de l'appareil ostéoarticulaire vont générer un hyper signal en diffusion. Cependant, les pathologies ischémiques osseuses augmentent la diffusion d'où un hyposignal en séquence de diffusion, et une augmentation d'ADC. Les modifications de la diffusion peuvent être étudiées dans un but diagnostique (caractérisation), ou dans un but pronostic (monitorage de l'évolution). Avant la caractérisation proprement dite d'une tumeur, le premier objectif est de différencier bénin/malin, et en cas de malignité, tissu tumoral/réaction inflammatoire. Plusieurs études réalisées chez l'adulte, qu'il s'agisse de tumeurs osseuses ou des parties molles montrent des résultats encourageants. Il existe toutefois des chevauchements importants dans les résultats. Certaines matrices tumorales pourraient révéler des valeurs d'ADC plus significatives : tumeurs cartilagineuses, lymphomes osseux. Par contre, un intérêt important de l'IRM de diffusion réside dans la surveillance de l'évolution sous traitement. L'apparition d'une nécrose au sein de la tumeur (témoin d'une efficacité thérapeutique) va augmenter la diffusion et les valeurs d'ADC intra-tumorales. Ces valeurs seraient un meilleur indicateur de réponse thérapeutique que d'autres critères tels que : volume, intensité du signal ou de la prise de contraste. L'IRM de diffusion pourrait aussi affiner l'appréciation du grade tumoral. En effet, en corrélant les paramètres de l'IRM de diffusion avec l'indice de marquage Ki-67, Lee et al ont montré que la valeur moyenne de l'ADC était significativement et inversement corrélée avec le Ki-67 ($\rho = -0,333$, $p = 0,047$) (131). L'IRM de diffusion joue sans doute un rôle dans le diagnostic et la prise en charge des tumeurs osseuses. Elle est actuellement la seule technique non invasive capable d'appréhender la structure microscopique d'un tissu.

La spectrométrie IRM (MRS) est une nouvelle technique à l'étude dans l'évaluation de la pathologie musculosquelettique. Cette technologie fournit des informations sur le métabolisme de la lésion en mesurant les métabolites produits abondamment par les tumeurs malignes, en particulier les composés contenant de la choline (Cho). En permettant une meilleure caractéri-

sation des tissus et une meilleure évaluation de la réponse au traitement, elle pourrait être utilisée pour différencier les tumeurs bénignes, des tumeurs malignes et comparer les tumeurs avant et après traitement. Les premières études ne sont pas concluantes, et manque de spécificité. Les principaux écueils sont liés au fait qu'un pic élevé de Cho peut également être perçu dans les lésions bénignes métaboliquement actives, et dans diverses affections : les tumeurs après traitement oncologique ainsi que les collections inflammatoires.

3. TEP et TEP-SCAN

La tomographie à émission de positrons (TEP) qui utilise le fluoro-desoxy-glucose (FDG) est le « gold standard » de l'imagerie métabolique. Elle révèle les tumeurs qui entraînent une augmentation anormale du métabolisme du glucose, par forte activité tumorale, surtout les TM de haut grade. Son utilité est reconnue dans la recherche des atteintes osseuses et des métastases. Le TEP-Scan, qui fusionne le TEP à des images scanner est indiqué pour le repérage spatial des zones pathologiques et pour le bilan d'extension des TM.

4. Perspectives à venir

De nos jours, l'attention se concentre sur le développement de systèmes hybrides qui permettrait de réaliser une évaluation diagnostique complète de la tumeur osseuse, avec le plus faible taux possible de radiation (important chez les patients pédiatriques). La TEP/IRM intégrée est une modalité d'imagerie en évolution, qui combine l'excellente résolution d'analyse des tissus mous de l'IRM, avec les capacités métaboliques fonctionnelles de la TEP. Cette méthode a donné des résultats encourageants en termes d'appréciation du stade, de la planification de la chirurgie et de la radiothérapie, l'évaluation de la réponse au traitement, tout en diminuant la dose de rayonnement cumulée chez les enfants ainsi que chez les patients adultes atteints de sarcome. D'autres études sont nécessaires pour établir son rôle définitif dans le futur.

L'introduction de l'intelligence artificielle (IA) dans l'analyse de l'imagerie musculo-squelettique, et de la radiomique, qui consiste à extraire de multiples paramètres issus de l'imagerie, ont entraîné le développement de modèles/signatures radiomiques basés sur l'IRM qui pourraient aider à distinguer les sarcomes de bas grade, des sarcomes de haut grade, à mieux apprécier la réponse aux traitements et la survie. Malinauskaite I et al ont montré que la radiomique (86 caractéristiques extraites à partir de l'IRM écho spin T1), associée à un modèle d'apprentissage automatique permettaient de différencier, un lipome, d'un liposarcome mieux que 3

radiologiques experts en pathologie ostéo-articulaire (132). À l'avenir, la combinaison de modèles utilisant des caractéristiques cliniques et radiomiques pourrait optimiser la stratification des patients pour une meilleure prise en charge.

Enfin, les développements de l'intelligence artificielle appliqués à l'oncologie musculo-squelettique restent cloisonnés à l'intérieur des différentes compétences : données cliniques, la radiologie, la médecine nucléaire, la pathologie, la biologie moléculaire. Du fait de la rareté des tumeurs osseuses primitives, une collaboration multidisciplinaire est indispensable pour intégrer et construire l'infrastructure du recueil de l'ensemble des données, utiles pour accélérer les progrès et rendre l'intelligence artificielle vraiment utile en oncologie musculo-squelettique.

5. Etude de la réponse à la chimiothérapie

Actuellement, l'évaluation de la réponse au traitement néo adjuvant est basée sur la quantification de la nécrose tumorale lors de l'examen microscopique de la pièce opératoire dans les OS. Les études radiologiques s'intéressent principalement à la prédiction de la réponse au traitement néo adjuvant avant résection chirurgicale pour adapter la prise en charge. L'imagerie de diffusion (DWI) est la technique d'imagerie non invasive la plus utilisée en recherche clinique pour évaluer la réponse à la chimiothérapie dans les OS de haut grade.

Saleh M et Al ont évalué la capacité des IRM multiparamétriques (IRM-DCE et IRM-DWI) à prédire la réponse à la chimiothérapie chez des patients atteints d'OS et de sarcomes d'Ewing (133). Les paramètres pris en compte dans cette évaluation étaient le changement de taille tumorale, le RECIST 1.1, le RECIST modifié, la valeur de l'ADC et le volume tumoral. Seules les variations de l'ADC (ADC%) étaient prédictives de la réponse thérapeutique avec des variations significativement plus élevés chez les bons réponders.

Une récente méta-analyse de 13 études incluant un total de 303 patients a confirmé la capacité de l'IRM-DWI à prédire la réponse à la chimiothérapie en corrélant la réponse histologique et les valeurs de l'ADC avant et après traitement (134). Cependant, une importante limitation actuelle de l'ADC est la non-standardisation entre les machines et la variation des méthodes d'acquisition et d'analyse ne rendant pas les valeurs ADC comparables entre les différents centres (135).

Un essai clinique prospectif monocentrique a évalué la tomographie par émissions de positrons au 18F-fluorodésoxyglucose (18F-FDG PET/CT) comme outil d'évaluation de la réponse précoce à la chimiothérapie néoadjuvante chez des patients pédiatriques atteints de sarcome (136).

Après 6 semaines de chimiothérapie néo adjuvante, l'intensité de l'activité métabolique résiduelle tumorale évaluée sur 18F-FDG PET/CT était associée au niveau de réponse thérapeutique pour tous les sarcomes étudiés excepté pour les OS.

L'intelligence artificielle, par l'intermédiaire notamment des données radiomiques extraites de l'imagerie au diagnostic, a également pour principal objectif dans les OS de prédire une réponse au traitement néo adjuvant. Dans une étude française, une analyse radiomique prenant en compte plusieurs caractéristiques à partir d'une séquence IRM T1 FS après injection de gadolinium, a permis d'effectuer une prédiction de la réponse au traitement néo adjuvant **(137)**. La limite principale de cette étude était de n'avoir examiné qu'une seule coupe de l'image (et non la totalité de la tumeur) du fait de la variabilité des protocoles de reconstruction des images d'IRM en fonction des centres et des épaisseurs de coupes.

Une autre étude multicentrique de 102 patients a établi une signature radiomique (33 caractéristiques extraites et classées), à partir de séquences IRM T1 Fat Sat après injection de gadolinium, qui était significativement associée à la réponse thérapeutique. L'élaboration de signatures radiomiques avec d'excellentes performances pourrait fournir un outil potentiel pour prédire la réponse histologique à la chimiothérapie néo adjuvante chez les patients atteints d'OS **(138)**. Dans ces différentes études, la segmentation des tumeurs et le calcul des paramètres radiomiques n'étaient pas effectués automatiquement, rendant l'analyse très chronophages. Pour arriver à une pratique clinique courante, le développement d'un logiciel disponible dans le commerce sera nécessaire pour effectuer la segmentation automatique de la tumeur et le calcul des paramètres radiomiques.

Très récemment, Helcio M. et Al ont pu prédire le risque de développer des métastases pulmonaires chez les patients avec un OS de haut grade en couplant un « classifieur » (algorithme de classification) et les caractéristiques radiomiques extraites d'images TDM avant traitement, sur une période de suivi minimum de 2 ans **(139)**. Le modèle s'est avéré reproductible et avec une haute précision chez les patients utilisant des protocoles et des TDM similaires. A notre connaissance, il s'agit de la seule étude radiomique utilisant des images TDM pour prédire le risque de métastases pulmonaires chez les patients atteints d'OS de haut grade.

Les modèles radiomiques se révèlent prometteurs pour répondre aux questions cliniques liées aux patients atteints d'ostéosarcome surtout, pour la réponse à la chimiothérapie néo adjuvante.

Cependant, conçu de manière prospective, des essais radiomiques bien validés avec des données ouvertes sont nécessaires pour démontrer leur efficacité et leur validité clinique.

De plus, un RQS (radiomics quality score) avec des améliorations continues pourrait servir d'outil pour faciliter la standardisation et l'implémentation de la radiomique en pratique clinique.

6. Etude du microenvironnement macrophagique et ostéoclastique

D'autres études se sont intéressées à une possible corrélation entre l'imagerie et les macrophages associés aux tumeurs, acteurs clés du microenvironnement du cancer (**140,141**). Les modalités d'imagerie moléculaire telles que l'IRM et la TEP peuvent être utilisées pour suivre et surveiller la dynamique des TAMs dans les tumeurs de manière non invasive, en se basant sur l'absorption spécifique et la quantification de nanoparticules détectables par IRM ou de radiotraceurs détectables par TEP (**142**).

Les anticorps monoclonaux (mAbs) CD47 activent les TAMs dans les sarcomes pour phagocytoser et éliminer les cellules cancéreuses. Bien que les anticorps monoclonaux CD47 aient fait l'objet d'essais cliniques, les tests diagnostiques permettant de surveiller la réponse au traitement *in vivo* font actuellement défaut. Le ferumoxytol est un supplément de fer approuvé par la FDA qui peut être utilisé comme agent de contraste : la molécule à base de nanoparticules est phagocytée par les TAMs et peut être détecté par l'IRM.

Une étude *in vitro* sur modèle murin a évalué si l'IRM renforcée par le ferumoxytol pouvait estimer la réponse des TAMs à la thérapie du mAb CD47 (anticorps monoclonaux CD47) dans les OS (**143**). Le rehaussement de la tumeur, quantifié par les temps de relaxation T2, a été comparé à la quantité de TAMs observée par microscopie à immunofluorescence et cytométrie en flux. L'étude a conclu que l'IRM du ferumoxytol pouvait détecter la réponse des TAMs au mAb CD47 dans des modèles murins d'OS. L'IRM avec injection de ferumoxytol pourrait être appliqué pour surveiller les thérapies à base de mAb CD47 dans les essais cliniques.

Une autre étude a comparé des séquences IRM par les temps de relaxation T2 après injection de ferumoxytol et au marquages des TAMs par anti-CD68/CD163 sur des coupes histologiques d'OS et de lymphomes (**144**). Le but de cette étude était de pouvoir stratifier les patients en fonction de l'importance de l'infiltrat en TAMs associé à un mauvais pronostic dans la majorité des cancers. Les résultats obtenus ont montré que l'IRM renforcée au ferumoxytol pouvait être utilisée comme biomarqueur de substitution pour évaluer l'infiltration TAMs dans les lym-

phomes et les sarcomes osseux pédiatriques (Figure 15). Cependant, le ferumoxytol est phagocyté par tous les sous types macrophages sans réelle distinction, hors nous avons montré que les macrophages CD68+ et CD163+ semblaient avoir des fonctions différentes dans la biologie des OS (145).

Aucune étude à ce jour n'a été faite dans les OS sur une possible corrélation entre la répartition des différentes populations macrophagiques et le caractère plutôt ostéocondensant ou ostéolytique déterminé sur les images radiologiques.

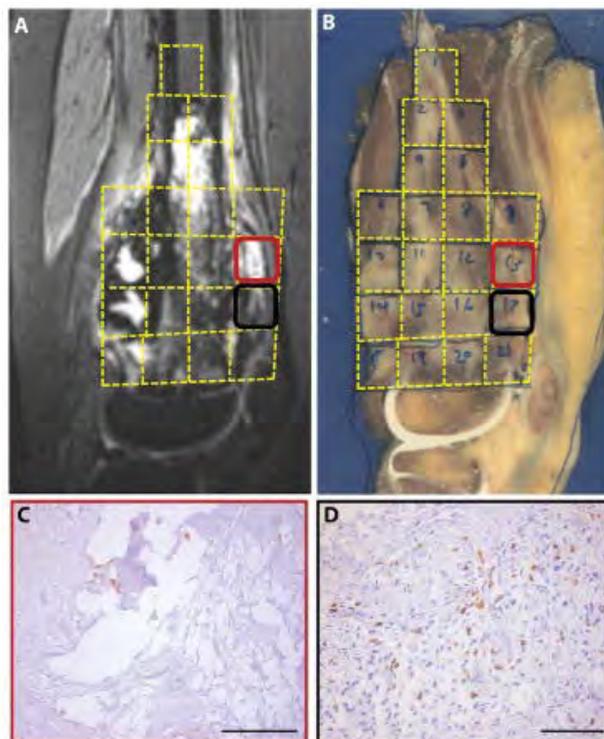


Figure 15 : Rehaussement au ferumoxytol d'un sarcome osseux corrélé avec la densité des TAMs CD68+ et CD163+ à l'histopathologie (Aghighi et Al, Clin Cancer Res., 2018 Sep)

(A) L'image sagittale STIR pondérée en T2 montre un rehaussement inhomogène du signal hypointense (sombre) d'un OS du fémur distal gauche (B) Spécimen histopathologique après résection de la tumeur (C) marquage CD163 d'une zone tumorale qui présentait un rehaussement minimal au ferumoxytol à l'IRM (carré rouge en A) montre une faible densité de TAM. (D) marquage CD163 d'une zone tumorale présentant un fort rehaussement au ferumoxytol à l'IRM (carré noir en A) montre une forte densité de TAM.

Récemment, la synthèse d'un mimétique de l'OPG (OP3-4), et son marquage avec un chélate de gadolinium, agent de contraste standard pour l'IRM ont été conçus (146). L'OPG est une molécule clé dans le remodelage osseux, car elle inhibe l'ostéoclastogenèse et l'activation des ostéoclastes. Ce nouveau peptide, DOTA-Gd-OP3-4, a pu être tracé par IRM et a montré un effet inhibiteur direct sur l'ostéoclastogenèse. Ces résultats ouvrent la voie au développement d'agents de contraste biospécifiques et bioactifs pour le diagnostic précoce, le traitement et le suivi des maladies osseuses métaboliques telles que l'ostéoporose et l'OS.

II. OBJECTIFS DE L'ETUDE

1) Renforcer notre hypothèse d'une distribution spatiale des populations macrophagiques en fonction des territoires cellulaires (CL) et des territoires riches en matrice ostéoïde (OM) en augmentant le nombre de biopsies que nous avons analysé dans la cohorte « OSnew » (145).

2) Corréler la distribution spatiale des populations du microenvironnement immunitaire sur la biopsie avec son imagerie (TDM et IRM) en relation avec l'ostéof ormation.

But : combiner les caractéristiques cliniques, histologiques et d'imagerie, pour une meilleure prise en charge thérapeutique.

3) Etudier la distribution spatiale des cellules du microenvironnement sur les pièces opératoires après chimiothérapie en fonction des zones de bonne (BR) et de mauvaises réponse (MR).

But : définir à partir du microenvironnement immunitaire une signature de résistance au traitement.

4) Construire une collection avec le couple biopsie/pièce opératoire, annotée, qui servira pour de futurs projets.

III. MATERIEL ET METHODES

A. Population d'étude

Nous avons constitué une cohorte rétrospective de 51 patients ayant eu un diagnostic d'OS de haut grade en région Midi-Pyrénées entre janvier 2010 et décembre 2020.

- Nous avons utilisé 51 biopsies fixées au formol et incluses en paraffine (FFPE) pour étudier la répartition du TME immunitaire et de la vascularisation en fonction des territoires CL/OM.
- Nous avons réalisé une analyse radiologique visant à estimer le caractère OL et OCD de la tumeur par deux méthodes différentes en utilisant des images TDM et IRM réalisées au moment du diagnostic.
- Dans cette même cohorte, nous avons sélectionné 20 pièces opératoires obtenues après traitement néoadjuvant dans le but d'observer la répartition du TME immunitaire et de la vascularisation dans les territoires de BR et MR. Nous avons sélectionné un seul bloc FFPE par pièce opératoire après un contrôle morphologique sur coupes histologiques colorée à l'hématoxyline et à l'éosine (HE).

B. Recueil de données cliniques et anatomopathologiques

Les données cliniques ont été recueillies de façon rétrospective à partir du dossier médical informatisé du CHU de Toulouse (Orbis), et de l'IUCT-Oncopole (DPI).

Les données anatomopathologiques ont été recueillies à partir des comptes rendus informatisés anatomopathologiques et d'analyse moléculaire du logiciel Diamic.

Les images radiologiques ont été exploitées à partir du programme du système d'archivage et de communication des images (PACS) du CHU de Toulouse.

Pour chaque patient, les données suivantes ont été recueillies :

- Age au diagnostic
- Sexe
- Localisation de l'OS
- Stade au diagnostic : localisé ou métastatique
- Examens radiologiques (IRM/TDM) réalisés au moment du diagnostic

Les données histopathologiques suivantes ont été recueillies :

- Sous-type histologique
- Évaluation 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.

C. Analyse spatiale et quantitative des TAMs, des lymphocytes T cytotoxiques et des vaisseaux

Pour améliorer notre compréhension du paysage immunitaire dans les OS de haut grade, nous avons quantifié les populations de TAMs, les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et les cellules endothéliales (cellules des parois vasculaires) par un marquage immunohistochimique fluorescent multiplexe couplée à une analyse d'image numérique dans le but de réduire au maximum les erreurs subjectives/humaines.

1. Marquages immunohistochimiques Fluorescents multiplexes

Dans un premier temps, nous avons étudié les différentes populations macrophagiques (CD163+ et/ou CD68+), et les CTL (CD8+) en relation avec les cellules ostéoblastiques (SATB2+) par immunofluorescence multiplexe sur les 51 biopsies composant notre cohorte de départ.

Par cette première analyse, nous voulions renforcer l'hypothèse d'une différence de distribution spatiale entre les différentes sous populations macrophagiques dans les territoires OM et CL. Le Discovery ULTRA (Roche, Ventana Medical Systems, Innovation Park Drive Tucson, Arizona 85755 USA) a été l'automate utilisé pour la procédure de coloration.

Protocole :

- **Déparaffinage** des lames
- **Prétraitement** à la chaleur en utilisant un tampon CC1 (pH8) (05424569001, Roche).
- **Coloration par immunofluorescence multiplex** à l'aide de la procédure RUO Discovery Universal (v0.00.0370) dans un protocole en 4 étapes avec dénaturation séquentielle (tampon CC2 (pH6), à 100 °C, 05279798001, Roche) après chaque étape.
- **Incubation en utilisant les anticorps primaires CD8** (clone C8/144B, M7103, Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) à une dilution de 1/200 (dans le diluant Envision Flex (K800621 2, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)), **CD163** (clone MRQ-26, 05973929001, Roche), **CD68** (clone KP-1, 05278252001, Roche) et **SATB2** (clone SATBA4B10, MSK101. 05, Diagnostics, Blagnac, France) à une dilution de 1/50 (dans le diluant Envision Flex (K800621-2, Agilent Technologies)).
- **Liaison des cibles à l'aide des anticorps secondaires** conjugués HRP OmniMap anti-lapin (05269679001, Roche) et OmniMap anti-souris (05269652001, Roche).

- **Visualisation des différentes cibles** grâce aux kits de détection Rhodamin6G (07988168001, Roche), RED610 (07988176001, Roche), Cy5 (07551215001, Roche) et FAM (07988150001, Roche).
- **Contre coloration** des lames à l'aide de Hoechst 33342 (H21492 (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), 1/500 dans Discovery Diluent (Roche)) et montage dans un milieu gélatineux (GG1, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

Le même protocole a été effectué sur les 20 pièces opératoires d'OS après traitement pour observer la distribution de ces mêmes cellules immunitaires par rapport aux territoires de BR et MR.

Dans un second temps, dans le but de quantifier la vascularisation dans les territoires OM/CL sur les biopsies ainsi que dans les territoires de BR/MR sur les pièces opératoires, nous avons appliqué le même protocole décrit ci-dessus en utilisant ERG (clone EPR3864, 06478450001, Roche) dans les biopsies et SMA (clone 1A4, 05318025001, Roche) dans les pièces opératoires.

2. Annotations des tumeurs numérisées

Les blocs FFPE des 51 biopsies et des 20 pièces opératoires d'OS de haut grade ont été déstockés puis ont fait l'objet d'un contrôle morphologique sur coupes histologiques colorée à l'HE par un pathologiste spécialiste des sarcomes osseux (Pr Anne Gomez-Brouchet). Ces lames ont ensuite été numérisées par un scanner de lames (Panoramic 250 Flash II – 3DHistech) pour ensuite être stockées sur le serveur de stockage du réseau interne de l'institution. A partir du logiciel CaseViewer (© 2005-2021, 3DHISTECH Ltd.), nous avons détourné sur chaque lame numérisée les deux zones morphologiquement distinctes d'intérêt dans notre étude : CL et OM pour les biopsies et de BR et MR pour les pièces opératoires.

Les lames colorées en immunofluorescence (IF) (voir protocole ci-dessus) ont été numérisées en 16 bits à l'aide du scanner à balayage intégral Zeiss AxioScan.Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne) équipé d'une source lumineuse à semi-conducteurs Colibri 7 et de cubes filtrants appropriés. Pour visualiser ces lames sur notre console, nous avons eu recours au logiciel d'analyse d'imagerie HALO® (Indica Labs, Albuquerque, NM, USA). Sur ce même logiciel, nous avons annoté les lames colorées en IF en retranscrivant les annotations déjà faites au préalable sur les lames colorées à l'HE numérisées (Figure 16).

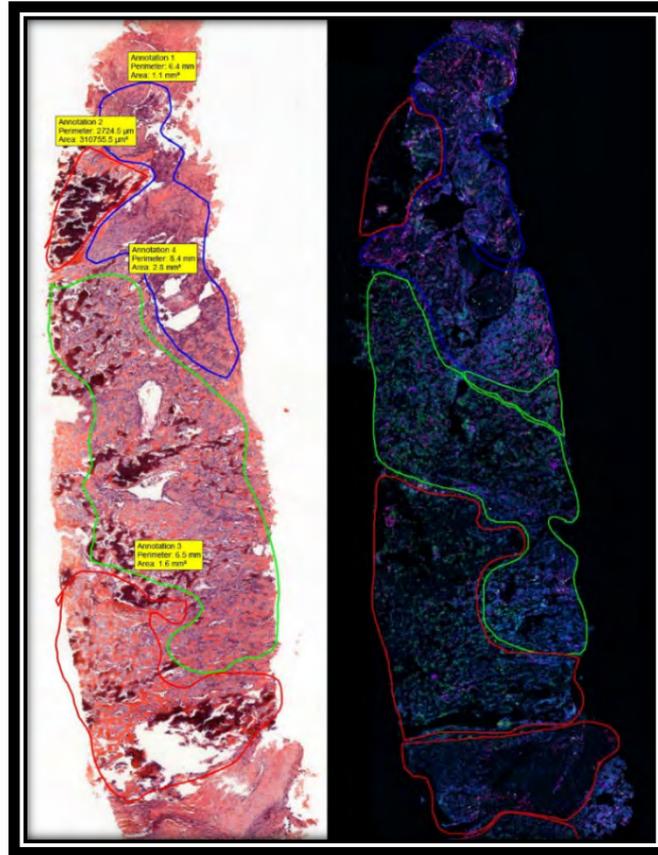


Figure 16 : Annotations faites sur la lame colorée à l'HE numérisée (CaseViewer) puis retranscrites sur la lame colorée à l'IF (HALO®)

3. Analyse des images numériques (HALO®)

Dans le cadre des OS, en raison d'un traitement pré-analytique hétérogène des échantillons utilisés, nous avons été obligés d'étudier chaque cas séparément pour déceler les variations de coloration pré-analytique et d'effectuer un traitement adapté de l'image de sortie pour un réglage correct du seuil. Ces variations de coloration pré-analytique comprenaient une variabilité de la coloration de Hoechst (noyaux), de la coloration de fond (matrice osseuse) et de l'intensité des marqueurs cellulaires. Les zones présentant des artefacts tels que des plis de tissus, fragments de tissus dégradés, ont été exclues de l'analyse.

a. Analyse numérique des biopsies

Pour analyser les deux panels d'immunohistochimie fluorescente multiplexe réalisés sur les biopsies (SATB2/CD68/CD163/CD8 et ERG/CD68/CD163/CD8), nous avons construit des algorithmes d'analyse d'image à l'aide du module High-Plex FL v3 d'Indica Labs permettant dans notre cas de mesurer la surface de chaque zone annotée, d'effectuer une segmentation nucléaire basé sur le Hoechst, et de détecter les 4 marqueurs fluorescents (Rhodamin6G, RED610, Cy5 et FAM).

Chaque marqueur fluorescent était associé à un anticorps primaire : *CD8 - Rhodamin6G* ; *CD163 - RED610* ; *CD68 - Cy5* ; *FAM – SATB2 ou ERG ou SMA*. La détection de ces différents marquages peut se faire dans tous les compartiments cellulaires notamment grâce un « élargissement » du noyau simulant ainsi un cytoplasme et une membrane artificielle. Les cellules colorées avec une intensité cytoplasmique/membranaire dépassant le seuil de réglage ont été comptées comme positives pour toute la gamme d'intensité de coloration (Figure 17).

Les résultats ont été représentés en pourcentage de cellules positives pour les phénotypes définis : *SATB2+* ou *ERG+* selon le panel utilisé, *CD8+*, *CD163+*, *CD68+* et les 3 différents phénotypes macrophagiques *CD68+/CD163+*, *CD68-/CD163+*, *CD68+/CD163-*.

b. Analyse des pièces opératoires

Pour l'analyse des pièces opératoires, nous avons utilisé le module Quantification Area d'Indica Labs qui permet de calculer la surface de chaque zone annotée et le pourcentage de surface marqué par les fluorochromes (Figure 17). Nous avons choisi d'utiliser ce module plutôt que le High-Plex car les noyaux sur les pièces opératoires n'étaient pas détectables à cause du processus de décalcification. Les résultats ont été représentés comme le pourcentage d'aire marquée pour les phénotypes définis : *SATB2+* ou *SMA+* selon le panel utilisé, *CD8+*, *CD163+*, *CD68+* et les 3 différents phénotypes macrophagiques *CD68+/CD163+*, *CD68-/CD163+*, *CD68+/CD163-*.

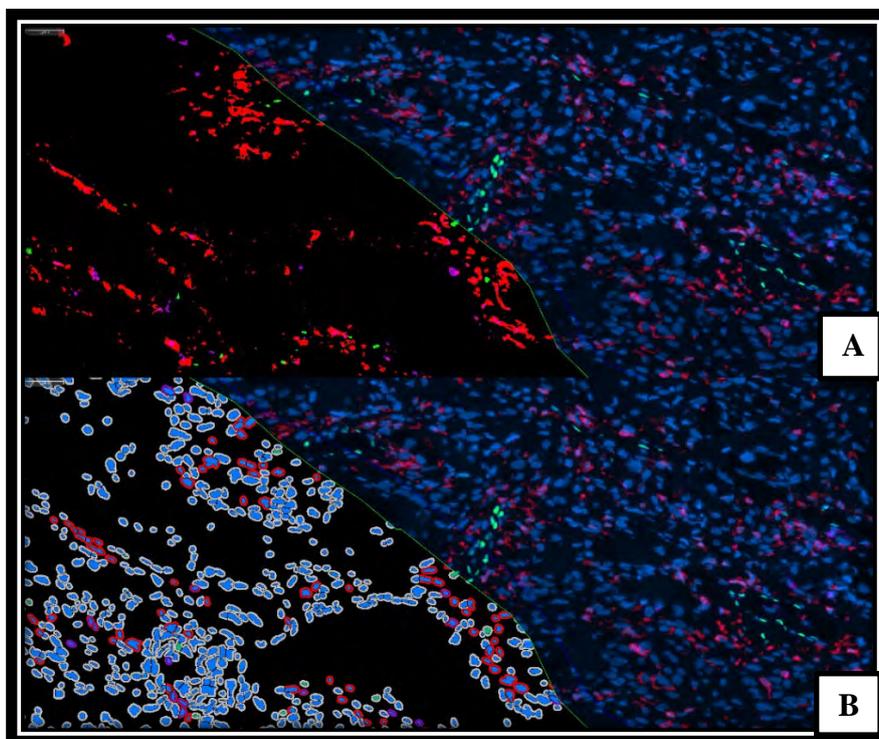


Figure 17 : Détection et quantification des marquages par 2 modules différents (HALO®)

(A) Module High-Plex FL et (B) Module Quantification Area

D. Evaluation radiologique du caractère ostéocondensant et/ou ostéolytique tumoral

1. Analyse radiologique manuelle

Nous avons exclu tous les patients pour qui le TDM ou l'IRM n'étaient pas disponibles pour notre analyse. Nous avons sélectionné tous les patients pour qui les 2 examens IRM et TDM avaient été faits au diagnostic. Les images étaient accessibles sur le PACS du CHU de Toulouse et un professeur universitaire toulousain, expert en radiologie ostéo-articulaire (Pr Marie Faruch), a effectué cette analyse radiologique classique.

Pour la réalisation de cette analyse, nous avons tout d'abord apprécié les limites tumorales sur les différentes séquences d'IRM à notre disposition. Les séquences pondérée T1 avec saturation du signal de la graisse et après injection intraveineuse de produit de contraste au gadolinium étaient privilégiées pour cette étape. Cette acquisition a permis de repérer de manière fiable les bords tumoraux, bien visibles grâce au rehaussement du signal de la tumeur après injection de produit de contraste en pondération T1. Grâce à cette délimitation de la tumeur sur l'IRM, nous avons pu relever la taille tumorale dans ses 3 plus grands axes et l'existence d'une possible extension dans les parties molles.

Après cette première étape de délimitation, nous avons analysé l'image TDM correspondante, et estimé le degré d'ostéocondensation global de la tumeur. Dans les sarcomes osseux, l'ostéocondensation se traduit sur les images TDM par des nuances de gris clairs (hyperdensité) et correspond au niveau histologique à la production d'une matrice osseuse tumorale plus ou moins mature (Figure 18).

A partir des images TDM, nous avons estimé le pourcentage d'OCD pour chaque tumeur analysée ainsi que le degré d'ossification de la masse dans les parties molles lorsqu'elle était présente.

Dans la grande majorité des cas, les protocoles d'acquisition d'images et les machines utilisées différaient car les images étaient importées sur le PACS à partir d'un CD provenant d'établissement extérieurs.

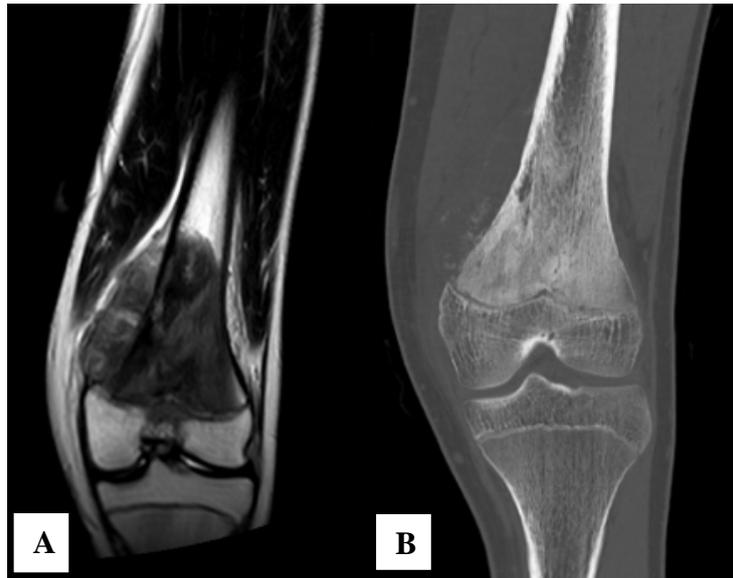


Figure 18 : OS conventionnel de haut grade du fémur distal.

(A) Appréciation des limites tumorales sur l'image IRM

(B) Taux d'ostéocondensation tumoral évalué à $>75\%$ sur cette image TDM

2. Analyse radiologique par segmentation

Pour évaluer l'ostéocondensation (OCD) et l'ostéolyse (OL) intra tumorale, nous avons mis au point une deuxième méthode, grâce à l'expertise de Pauline Assemat chercheuse (CR, CNRS) à l'IMFT (Institut Mécanique des Fluides de Toulouse), basée sur une série de calculs mathématiques.

Le traitement des images radiologiques a été effectué sur le logiciel « AVIZO » (Copyright (c) 1995-2019 Konrad-Zuse-Zentrum für Informationstechnik Berlin (ZIB), Germany " Copyright (c) 1999-2019 FEI SAS, a part of Thermo Fisher Scientific.) Nous avons défini un workflow qui correspond à une liste d'algorithmes successifs.

Cette analyse par segmentations comprend plusieurs grandes étapes :

a. Sélection et chargement des images

Nous avons sélectionné les images TDM et IRM de 6 patients avec un OS situé autour de l'articulation du genou dans l'optique de faciliter la réalisation de cette méthode. Les images de chaque cas ont été anonymisées et téléchargées à partir du PACS du CHU de Toulouse au format DICOM sur un disque de stockage externe. Seuls les stacks d'images passant par un plan coronal et sagittal ont été chargés sur le logiciel « AVIZO ».

b. Recalage de l'image IRM sur l'image TDM

En traitement d'image, le recalage est une technique qui consiste en la « mise en correspondance d'images », ceci afin de pouvoir comparer ou combiner leurs informations respectives. Nous avons projeté les images d'IRM sur les images TDM correspondantes par l'intermédiaire d'un algorithme de registration « Image Registration Wizard ». Par un calcul de corrélation, un recalage rigide a été effectué car on suppose qu'il n'y a pas d'étirement (cisaillement) dans les images (Figure 20).

c. Segmentation et modélisation 3D de la tumeur (IRM)

La segmentation d'image (Figure 19) est une opération de traitement d'images qui a pour but de rassembler des pixels entre eux suivant des critères prédéfinis. Cette étape a été possible grâce à un logiciel de segmentation dans lequel 3 algorithmes successifs aboutissant à la construction d'un volume en 3D de la tumeur :

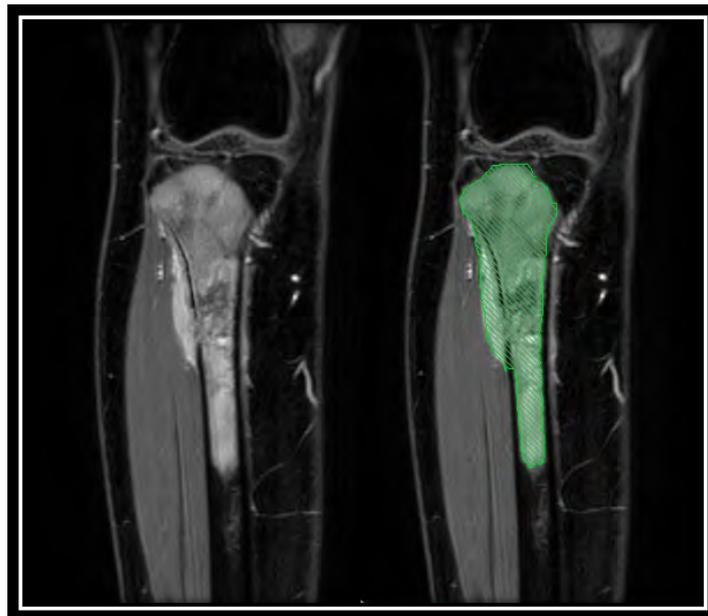


Figure 19 : Segmentation 2D de la tumeur (vert) à partir d'une coupe coronale sur l'IRM

i. Région de croissance

A partir de l'image IRM, on fixe un point de départ appelé « graine » dans la région d'intérêt, c'est-à-dire la zone tumorale dans notre cas. A partir de ce point de départ, l'objectif est d'agrandir la région en agglomérant des pixels voisins. Les pixels choisis doivent maintenir l'homogé-

néité de la région. Pour cela, un indicateur d'homogénéité est défini et correspond aux différentes nuances de gris similaires à la nuance de gris initiale (« graine »). La croissance s'arrête lorsqu'on ne peut plus ajouter de pixels sans briser l'homogénéité.

ii. Outil lasso associé à des algorithmes de nettoyage

Le lasso est un outil de sélection manuel 3D qui va nous servir à sélectionner des zones nécessitant un « nettoyage ». Le nettoyage permet l'élimination des régions autour de la tumeur qui ne sont pas définies dans la segmentation. On fait ainsi défiler les différents stacks d'image pour vérifier que seule la zone tumorale a été sélectionnée. L'utilisation d'algorithmes de nettoyage, Island Removal et Smoothing dans notre cas, est préconisée du fait de la faible résolution des images cliniques.

L'algorithme Island Removal enlève les « ilots » non connectés à la tumeur, et le Smoothing effectue un lissage de l'image segmentée.

iii. Remplissage de trou

L'objectif ici est de remplir « les trous » présent dans la zone segmentée lié au bruit de l'image. Pour finir, on obtient le volume tumoral total en multipliant la taille du voxel (unité d'information graphique qui définit un point dans un espace tridimensionnel), par le nombre de voxel compris dans la zone segmentée.

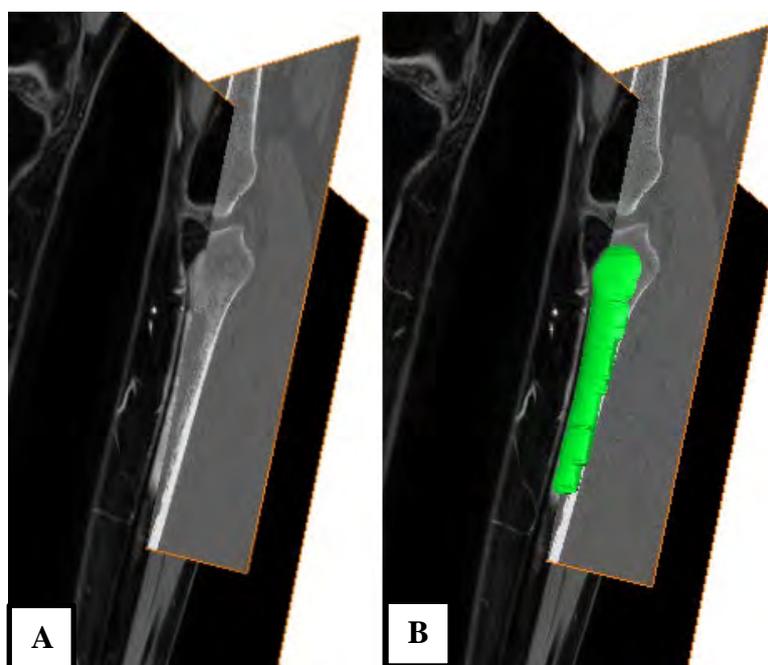


Figure 20 : Registration ou recalage des images IRM et TDM.
(A) Registration sans segmentation
(B) Registration avec segmentation (contour tumoral issu de l'IRM en vert)

d. Segmentation des zones OL/OCD dans l'os spongieux (TDM)

Nous avons utilisé exactement la même technique de segmentation que pour l'IRM décrite ci-dessus.

L'objectif de cette seconde segmentation à partir des images TDM était de segmenter la tumeur en zones OL/OCD en se basant sur des nuances de gris (Figure 21 et 22).

Les zones avec des nuances de gris claires étaient considérées comme OCD tandis que les zones avec des nuances de gris foncées étaient classées comme OL.

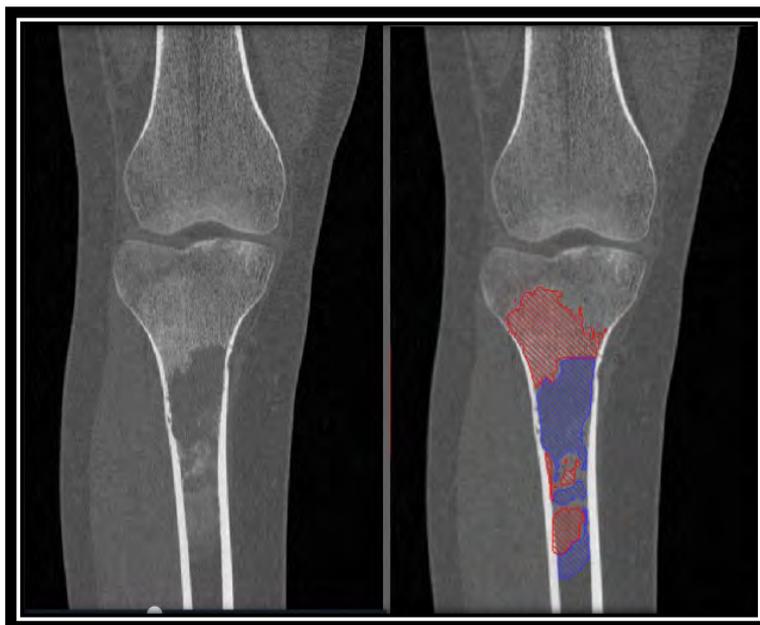


Figure 21 : Segmentation 2D des zones OL (bleu) et OCD (rouge) sur la coupe coronale du TDM

e. Calcul des volumes OCD/OL

Pour calculer le volume des zones OL/OCD segmentées, nous avons eu recours à la fonction « Material Statistics ». Cette fonction effectue un comptage automatique du nombre de voxels présents dans chaque zone segmentée (OL/OCD) qu'il nous suffisait ensuite de multiplier par la taille du voxel. Pour avoir le pourcentage total d'OL et d'OCD, il nous a suffi de diviser le volume de chaque zone par le volume tumoral total.

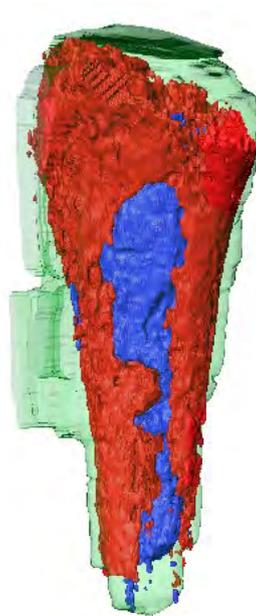


Figure 22 : Segmentation 3D des territoires OL (bleu) et OCD (rouge) à partir de la première segmentation de la tumeur (vert)

E. Tests statistiques

La comparaison de l'infiltrat immunitaire et des vaisseaux entre les zones CL et OM sur les biopsies a été faite avec le test de Mann-Whitney pour les variables quantitatives.

La comparaison de l'infiltrat immunitaire et des vaisseaux entre les zones BR et MR sur pièce opératoire a été faite avec le test de One-Way ANOVA pour les variables quantitatives.

Une corrélation de Spearman a été faite pour étudier la corrélation entre le ratio CD163/CD68 évalué sur biopsie et le taux d'ostéocondensation évalué sur l'imagerie.

Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs lorsque $p < 0.05$.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Minitab (© 2021 Minitab, LLC. All Rights Reserved).

IV. RESULTATS

A. Données cliniques

21 patients ont été exclus de notre étude. Ces patients ont été exclus de l'analyse en raison de limites techniques : décollement du tissu de la lame, artefacts trop importants (plis, fragments dégradés), noyaux cellulaires non détectables et marquages non interprétables.

Au total, notre étude a porté sur 30 patients sur notre série Toulousaine. Les données cliniques ont été analysées et les caractéristiques de la population de notre étude sont résumées dans le Tableau 4.

Les 30 patients de notre étude étaient âgés de 5 à 86 ans au moment du diagnostic. Dans l'ensemble des cas, l'âge moyen était de 26,2 ans et l'âge médian de 17,5 ans.

Il existait une légère prédominance féminine avec un sex ratio de 1,3 : 1 dans l'ensemble des cas.

Les OS analysés étaient tous de haut grade :

- Conventionnel de type ostéoblastique pour 17 patients (56.7%), chondroblastique pour 3 patients (10%) et de type fibroblastique pour 2 patients (6.7%).
- Secondaire (dysplasie fibreuse et en territoire irradié) pour 3 patients (10.0%)
- Télangiectasique pour 2 patients (6.7%)
- Chondroblastique de surface pour 2 patients (6.7%)
- Périosté chondroblastique de surface pour 1 patient (3.3%)

23 patients ont suivi un schéma thérapeutique classique curateur avec une évaluation de la réponse à la chimiothérapie néo adjuvante sur la résection chirurgicale. 13 patients étaient bon répondeurs (44.3%) et 10 mauvais répondeurs (33.3%). 7 patients n'ont pas reçu de traitement curateur (23.3%).

Notre série comptait 15 patients (50.0%) atteints d'un OS localisé au fémur, dont 10 cas à l'extrémité inférieure (33.3%), 2 cas à l'extrémité supérieure (6.7%), 3 cas sur la diaphyse (10%). Les autres localisations les plus touchées étaient le tibia (5 patients, 16,7%, dont 4 cas à l'extrémité supérieure et 1 cas sur la diaphyse), la bassin (4 patients, 13.3%), l'extrémité supérieure de l'humérus (3 patients, 10.0%) et la cote (3 patients, 10.0%).

Tous des patients ont eu une IRM (100.0%) au moment du diagnostic tandis que seulement 14 ont effectué une TDM (46.7%).

Tableau 4 : Résumé des caractéristiques cliniques des patients analysés

		n = 30	
Age au diagnostic		Nb	%
	< 18 ans	16	53,3%
	> 18 ans	14	46,7%
Sexe			
	F	17	56,7%
	H	13	43,3%
Localisation			
	Fémur	15	50,0%
	Tibia	5	16,7%
	Humérus	3	10,0%
	Bassin	4	13,3%
	Côte	3	10,0%
Sous type histologique (haut grade)			
	Ostéoblastique	17	56,7%
	Chondroblastique	3	10,0%
	Fibroblastique	2	6,7%
	Secondaire	3	10,0%
	Télangiectasique	2	6,7%
	Chondroblastique de surface	2	6,7%
	Périosté de type chondroblastique	1	3,3%
Réponse au traitement			
	BR	13	43,3%
	MR	10	33,3%
	Absence de traitement curatif	7	23,3%
Imageries au diagnostic			
	IRM	30	100,0%
	TDM	14	46,7%
Stade au diagnostic			
	Localisé	21	70,0%
	Métastatique	8	26,7%
	Non renseigné	1	3,3%
Décès		10	33,3%

B. Analyse numérique multiplexe par fluorescence de l'hétérogénéité spatiale des cellules du microenvironnement tumoral sur les biopsies

Cette analyse a été faite sur les 30 biopsies. Les populations macrophagiques (CD163+ et/ou CD68) et les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) ont été analysés sur une surface tumorale totale de 2959,3 mm², morphologiquement divisée en deux régions : cellulaire (CL, 85.6%, 2529,6 mm²) et riche en matrice ostéoïde (OM, 14.5%, 429,6 mm²).

Quatre biopsies ne contenaient pas de région tumorale CL (13.3%), 17 biopsies ne contenaient pas de régions tumorales OM (56,7%). La divergence entre le nombre de régions OM et CL est liée au site de la biopsie qui intéressait préférentiellement les zones riches en cellules (CL).

1. Répartition des cellules ostéoblastiques SATB2+

On observait une différence de densité en cellules ostéoblastiques (SATB2+ nucléaire) entre les zones CL (moyenne 804.7 cellules/mm²) et les zones OM (moyenne 327.7 cellules/mm²). Cette différence était statistiquement significative ($p < 0.001$) (Figure 23). Les régions OM étaient caractérisées par une matrice osseuse abondante et une faible cellularité, tandis que les régions CL présentaient une forte densité cellulaire avec une matrice presque absente. L'anti-corps anti-SATB2 avait une forte sensibilité pour les ostéoblastes et les ostéocytes. Le marquage était faible ou absent dans les cellules ostéosarcomateuses avec des atypies cyto-nucléaires très marquées ou lorsque qu'elles avaient une différenciation chondroblastique.

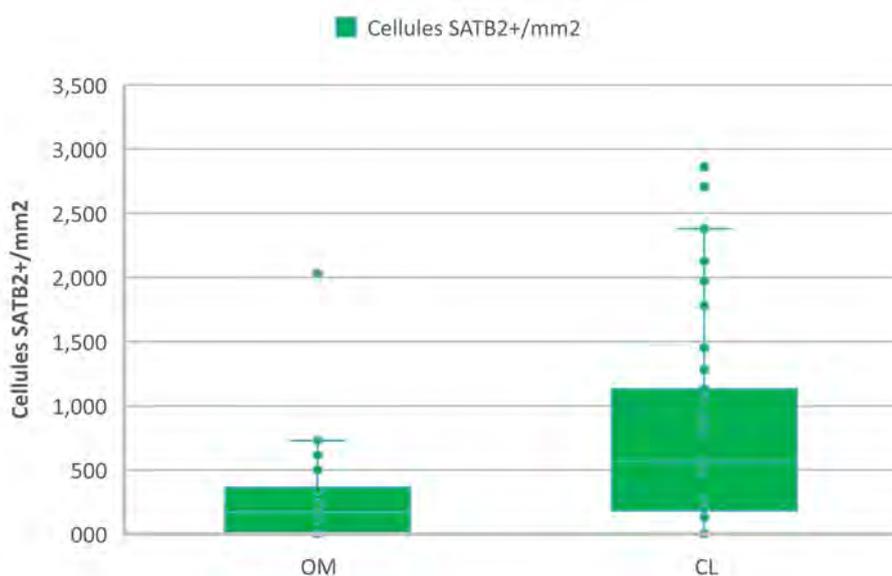


Figure 23 : Comparaison de la densité en cellules ostéoblastiques SATB2+ entre les zones cellulaires (CL) et riches en ostéoïde (OM).

2. Répartition des lymphocytes T cytotoxiques CD8+

Le comptage cellulaire automatisé a révélé que les CTL (CD8+) étaient rares et ne représentaient que 0,59% (moyenne) de la population cellulaire globale étudiée. On a constaté que les CTL étaient légèrement plus nombreux dans les régions cellulaires (CL : moyenne 0,76% ; OM : moyenne 0,51%) sans différence statistique significative ($p < 0.165$) (Figure 24).

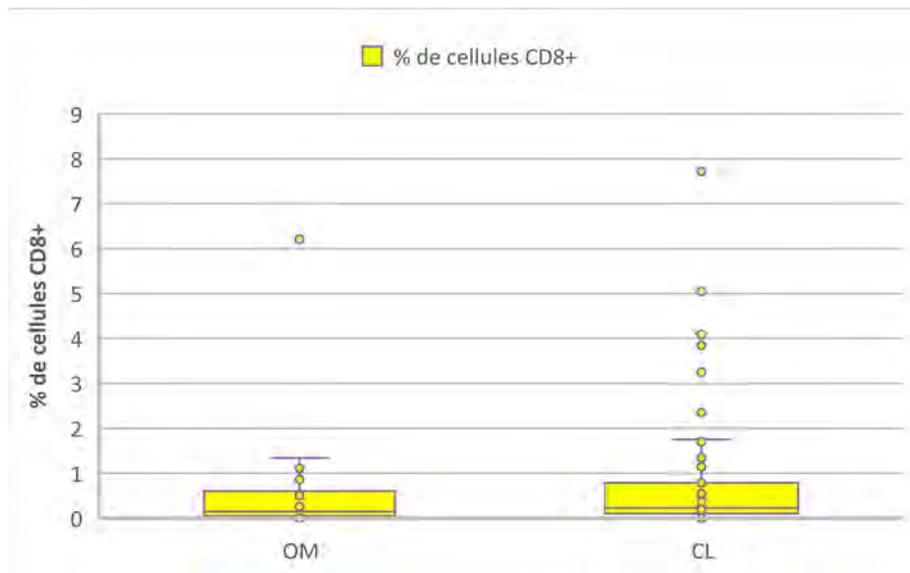


Figure 24 : Distribution en % des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ sur la population cellulaire globale étudiée entre les zones cellulaires (CL) et riches en ostéoïde (OM).

3. Répartition des populations macrophagiques CD163+ et/ou CD68+

Dans ces nouvelles analyses, on a constaté une différence de répartition parmi les populations macrophagiques en rapport avec les territoires CL et OM (Figure 25).

Dans les zones OM, on a observé une assez large prédominance des macrophages de phénotype CD163+/CD68- (moyenne 12.2 %). Les OCs (CD68+/CD163-) (moyenne 3.0 %) et les macrophages doublement positifs CD68+/CD163+ (moyenne 4.2 %) étaient minoritaires.

Dans les zones CL, on a observé un rééquilibrage entre les différents phénotypes macrophagiques, entraînant une population plus homogène composée de macrophages CD163+/CD68- (moyenne de 11.3 %) associée à un important recrutement de macrophages OCs (CD68+/CD163-) (moyenne de 7.0 %) et doublement positifs (CD68+/CD163+) (moyenne de 8.7%).

Cette différence d'infiltration concernant la population OCs (CD68+/CD163-) était significative statistiquement ($p < 0.0004$) entre les régions OM et CL.

Il existait également une augmentation des macrophages doublement marqués (CD163+/CD68+) dans les zones CL par rapport aux zones OM ($p < 0.013$).

Il n'était pas observé de différence significative ($p < 0.771$) concernant l'infiltrat des macrophages CD163+/CD68-.

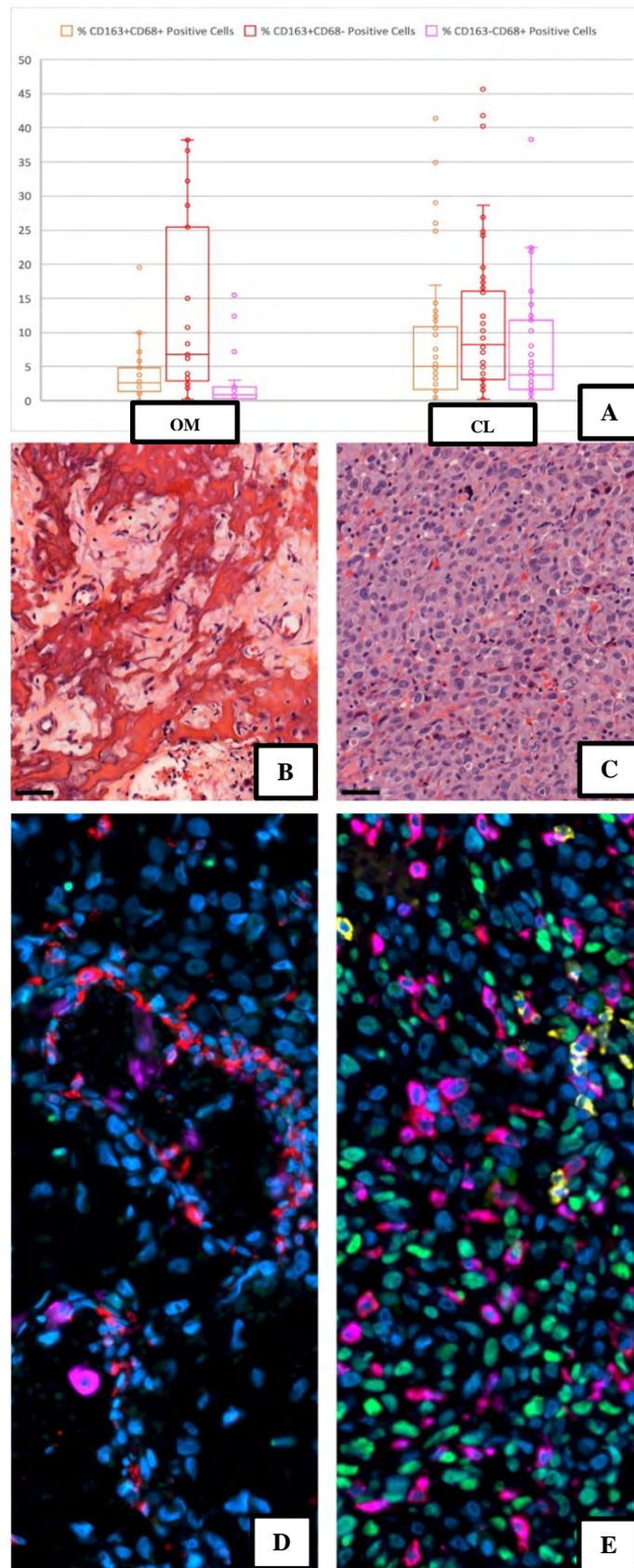


Figure 25 : Populations de macrophages, lymphocytes T cytotoxiques, et cellules ostéoblastiques étudiées par immunohistochimie multiplex sur biopsies.

(A) : Histogrammes représentant le pourcentage des différentes populations de macrophages dans les régions OM (gauche) et CL (droite) ;
 (B) régions OM et (C) CL sur la coloration à l'HE ;
 (D) régions OM et (E) CL colorées en IF :
 CD68+CD163+ (rose), CD68-CD163+ (rouge), CD68+CD163- (violet) ; CD8+ (jaune) ; SATB2+ (vert)

4. Répartition des cellules endothéliales ERG +

Le comptage cellulaire automatisé nous a révélé que la densité en cellules endothéliales (ERG+) représentatives des structures vasculaires était plus élevée dans les zones CL (moyenne 125.2 cellules/mm²) par rapport aux zones OM (moyenne 37.4 cellules/mm²) avec une différence statistique significative ($p < 0.015$) (Figure 26).

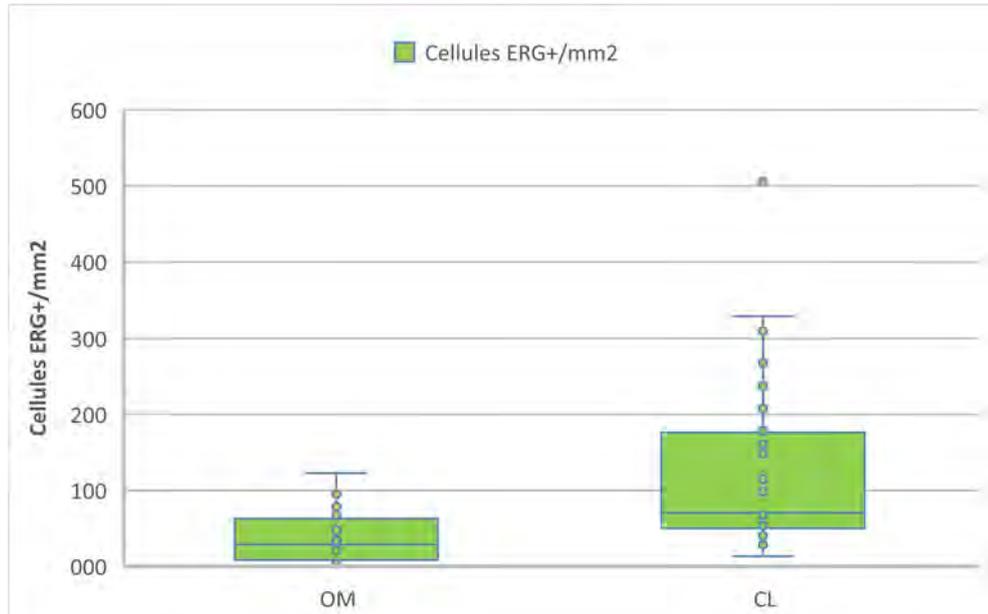


Figure 26 : Comparaison de la densité en cellules endothéliales ERG+ sur la surface étudiée entre les zones cellulaires (CL) et riches en ostéoïde (OM).

C. Analyse radiologique manuelle

Parmi les 51 cas de notre cohorte, seulement 24 patients avaient à disposition une IRM associée à une TDM avant traitement. 3 patients avec des OS de surface ont été exclus de notre analyse radiologique car ils ne permettaient pas une évaluation de l'ostéocondensation du spongieux.

Au total, notre analyse a porté sur 21 patients de notre série Toulousaine. Les données que nous avons récoltées pour chaque imagerie (IRM et TDM) sont résumées dans le Tableau 5.

Notre série comptait 5 patients (23.8%) atteints d'un OS localisé au fémur, dont 4 cas à l'extrémité inférieure et 1 sur la diaphyse. Les autres localisations les plus touchées étaient le tibia (5 patients, 23.8%, dont 4 cas à l'extrémité supérieure et 1 cas à l'extrémité inférieure), la bassin (4 patients, 19.0%), l'extrémité supérieure de l'humérus (3 patients, 14.3%), la mandibule (2 patients, 9.5%), la fibula (1 patient, 4.8%) et la cote (1 patient, 4.8%).

Notre analyse a estimé que 5 patients (23.8%) avaient une tumeur avec < 25% d'ostéocondensation du spongieux, 3 patients (14.3%) entre 25 et 50%, 4 patients (19.0%) entre 50 et 75% et 9 patients (42.9%) avec > 75%.

Au total, 8 patients étaient classés en ostéolytiques (0-50%) et 13 en ostéocondensants (>50%). Les tumeurs avec >50% OCD du spongieux présentaient très souvent une ossification de la masse dans les parties molles lorsqu'elle était présente.

Tableau 5 : Données récoltées sur l'analyse radiologique classique

		n = 21	
Localisation			
	Fémur	5	23,8%
	Tibia	5	23,8%
	Humérus	3	14,3%
	Bassin	4	19,0%
	Mandibule	2	9,5%
	Fibula	1	4,8%
	Côte	1	4,8%
Ostéocondensation du spongieux			
	< 25%	5	23,8%
	25-50%	3	14,3%
	50-75%	4	19,0%
	> 75%	9	42,9%
Masse parties molles			
	Oui	18	85,7%
	Non	3	14,3%
% de masse extraosseuse ossifiée			
	< 25%	9	50,0%
	25-50%	4	22,2%
	50-75%	0	0,0%
	> 75%	5	27,8%

D. Analyse radiologique par segmentation algorithmique

Par cette approche, nous avons pu étudier 6 cas. Cette méthode par segmentation a permis de mieux caractériser la proportion des territoires OL en intra osseux et OCD sur le volume total. Cinq cas ont été considérés comme OCD (cas 1, 2, 4, 5 et 6), et un cas comme OL (cas 3).

La comparaison avec l'approche manuelle a montré qu'il n'existait que peu de différence entre les 2 méthodes en ce qui concerne le pourcentage de volume OCD relativement au volume total de la tumeur (Tableau 6). En revanche le volume total de la tumeur peut varier d'une méthode à l'autre sachant que la méthode manuelle mesure le volume de la tumeur sur une ellipsoïde équivalente dont les axes sont les plus grandes dimensions de la tumeur.

Tableau 6 : Comparaison des 6 cas analysées en méthode manuelle et par segmentation

Cas n°	Analyse manuelle			Analyse par segmentation				
	Volume cm3 (ellipsoïde)	% OCD spongieux	% ossification PM	Volume IRM cm3	Volume OCD cm3	% OCD total	Volume OL cm3	% OL spongieux
1	126	>75%	>75%	166	48	30	8	5
2	88	50-75%	∅	109	45	41	16,5	15
3	170	25-50%	25-50%	228	35.5	15	138	60
4	54	>75%	25-50%	56	23	41	4	7
5	88	>75%	25-50%	135	59	43	2,5	2
6	220	>75%	< 25%	257	87.5	34	10	4

Les cas n°1, 2, 4, 5 et 6 considérés comme OCD (> 50%) en méthode manuelle, avaient un % d'OCD supérieur au % d'OL par la méthode par segmentation.

La tumeur n°3 considérée comme OL (0-50%) en méthode manuelle, avait un % d'OL supérieur au % d'OCD par la méthode par segmentation.

Les volumes tumoraux non classés/segmentés correspondaient à des territoires « mixtes », et aux territoires qui n'étaient pas OCD dans les PM.

Notons que la méthode de segmentation algorithmique n'est à l'heure actuelle que semi-automatique du fait du faible contraste et de la faible résolution des images. De futurs développements par des spécialistes de l'imagerie pourraient permettre de mieux quantifier les volumes OL et OCD en utilisant des techniques de moyennisation couplées éventuellement à des méthodes de machine ou deep learning et en effectuant des opérations algébriques entre TDM de patients contrôle et atteints de OS. S'il ne semble pas y avoir de verrou scientifique au développement d'une telle méthode, sa mise en œuvre est relativement complexe et elle n'a pas pu être réalisée dans le cadre de cette thèse.

E. Evaluation du ratio de macrophages CD163+/CD68+ et corrélation avec le caractère ostéocondensant sur l'imagerie

1. Distribution du ratio de macrophages CD163+ sur les OCs CD68+

L'analyse numérique multiplexe par fluorescence que nous avons effectuée précédemment nous a montré que les zones CL étaient beaucoup plus riches en OCs (CD68+/CD163-) en comparaison des zones OM de manière significative. Cependant, les macrophages CD163+/CD68- étaient prédominant dans ces deux territoires morphologiquement distincts. Pour mieux définir l'implication des macrophages CD163 dans les zones OM et des CD68 dans les zones CL, nous avons étudié le rapport ou ratio entre ces 2 populations. Nous avons retrouvé une différence significative de ce ratio ($p < 0.05$) entre les deux territoires (Figure 27). Les territoires CL étant beaucoup plus riches en OCs CD68+/CD163-, le ratio de macrophages CD163+ / CD68+ était donc plus élevé dans les territoires OM.

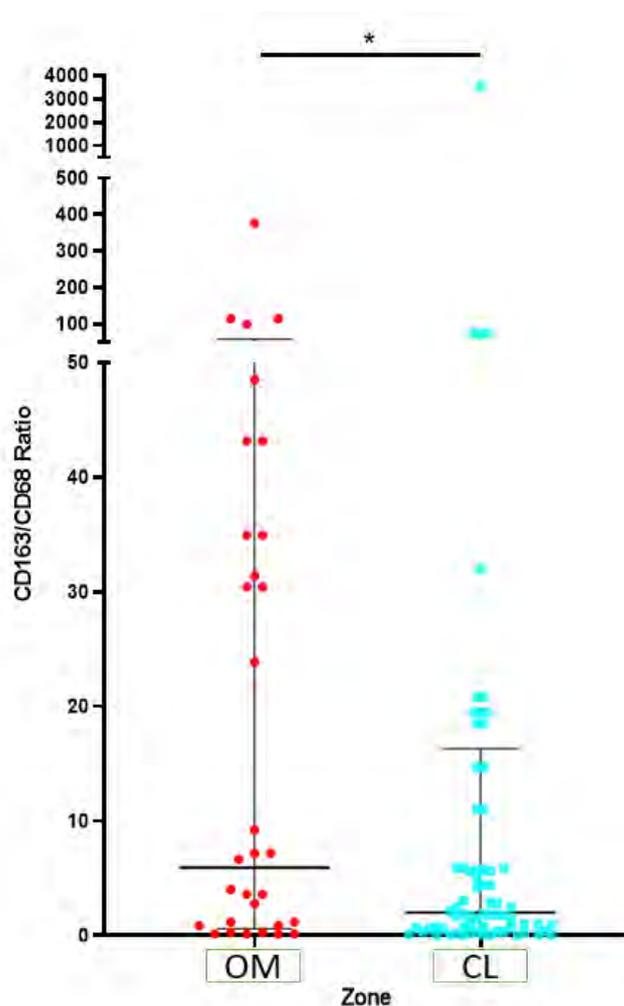


Figure 27 : Distribution du ratio de macrophages CD163+ / OCs CD68+ en fonction du type de zone cellulaire (CL) et riches en ostéoïde (OM).

2. Corrélation entre le ratio de macrophages CD163+/CD68+ évalué sur la biopsie et le caractère ostéocondensant évalué sur l'imagerie par la méthode manuelle

A partir de ces résultats, nous avons tenté de trouver une corrélation entre le ratio CD163+/CD68+ établi sur la biopsie et le pourcentage moyen d'OCD apprécié à partir de l'imagerie correspondante avec la méthode manuelle. Nous avons fait l'hypothèse que plus une tumeur sera considérée comme OCD sur l'imagerie, plus son ratio macrophagique CD163+/CD68+ sera élevé dans le TME.

Sur les 21 patients avec une analyse radiologique manuelle, seulement 9 ont été analysés en immunohistochimie fluorescente multiplexe.

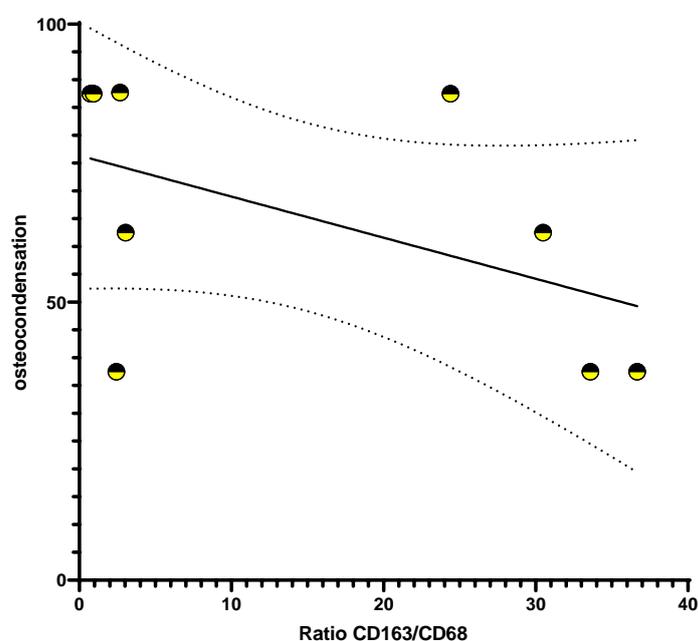


Figure 28 : Représentation du pourcentage d'ostéocondensation en fonction du ratio CD163/CD68. Les courbes en pointillés ainsi que la droite en trait plein représentent la régression linéaire de ces deux variables.

Sur ces 9 cas, nous n'avons pas trouvé de corrélation significative ($r = -0.5545$; $p = 0.1246$) entre le ratio CD163/CD68 et le pourcentage d'ostéocondensation. On peut d'ailleurs observer une tendance inverse entre le taux d'ostéocondensation et le ratio CD163/CD68 comme le montrent la régression linéaire (Figure 28) et la négativité du coefficient de corrélation. Cependant, ces résultats sont à interpréter avec prudence du fait du faible nombre d'échantillons analysés. De plus ces biopsies ciblées préférentiellement dans des zones cellulaires (CL) sont parfois peu représentatives de l'hétérogénéité tumorale évaluée sur l'imagerie.

F. Analyse numérique multiplexe par fluorescence de l'hétérogénéité spatiale des cellules du microenvironnement tumoral sur les pièces opératoires

Sur les 20 pièces opératoires sélectionnées au départ, nous avons pu en analyser 14 au total. Les 6 pièces opératoires exclues présentaient des décollements du tissu de la lame, artefacts trop importants (plis, fragments dégradés), et marquages non interprétables.

Les populations macrophagiques (CD163+ et/ou CD68) et les CTL (CD8+) ont été analysés sur une surface tumorale totale de 2093,7 mm², morphologiquement divisée en deux régions : bonne réponse (BR, 49.9%, 1044.8 mm²) et mauvaise réponse (MR, 50.1%, 1048.9 mm²).

Une seule pièce opératoire analysée ne contenait pas de région de BR (7.1%), 8 pièces opératoires ne contenaient pas de régions tumorales de MR (57.1%). La divergence entre le nombre de pièces opératoires contenant des territoires de BR et MR était liée au fait que le traitement par chimiothérapie néo adjuvante a eu un effet sur la quasi-totalité des pièces opératoires analysées.

1. Répartition des cellules ostéoblastiques SATB2+

On observait une très légère différence du pourcentage de surface marquée par l'anticorps anti-SATB2+ entre les zones de BR (moyenne 1.8%) et les zones de MR (moyenne 1.0%) (Figure 29). Cette différence n'était pas statistiquement significative ($p < 0.868$). Dans les régions de BR, la nécrose prédominait avec très peu de cellules viables marquées. Dans les territoires de MR, comme sur les biopsies, l'anticorps anti-SATB2 avait une faible sensibilité pour les cellules très atypiques (post chimiothérapie) et de différenciation chondroblastique.

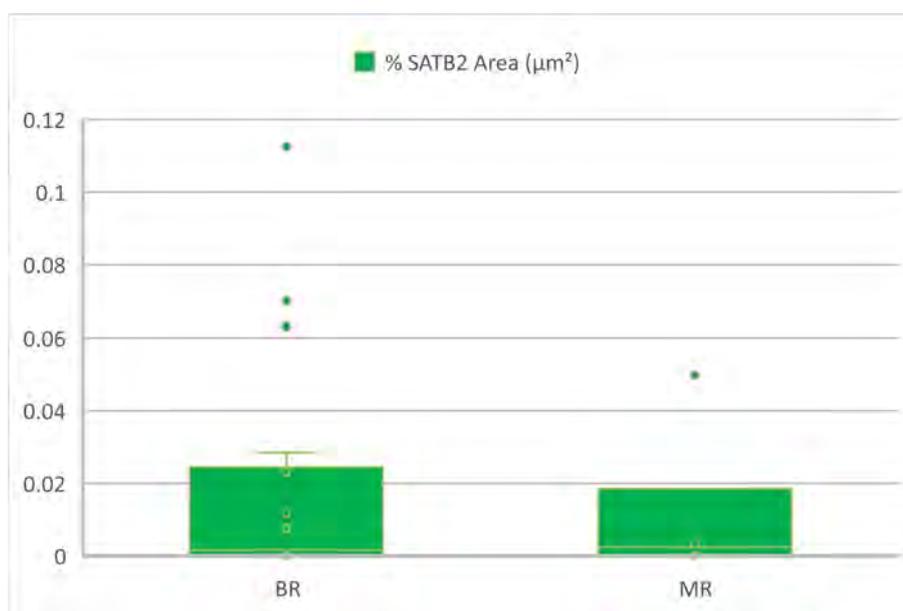


Figure 29 : Distribution en % de surface marquée par SATB2+ sur la surface totale étudiée entre les zones de bonne réponse et de mauvaise réponse.

2. Répartition des lymphocytes T cytotoxiques CD8+

Le calcul du pourcentage de la surface marquée par l'anticorps anti-CD8 a révélé que les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ étaient très peu représentés et ne représentaient que 0,04% (moyenne) de la surface globale étudiée (Figure 30). On constatait que les CTL (CD8+) étaient légèrement plus présents dans les régions de mauvaise réponse (MR : moyenne 0,11% ; BR : moyenne 0,02%) sans toutefois de différence statistique significative ($p < 0.170$).

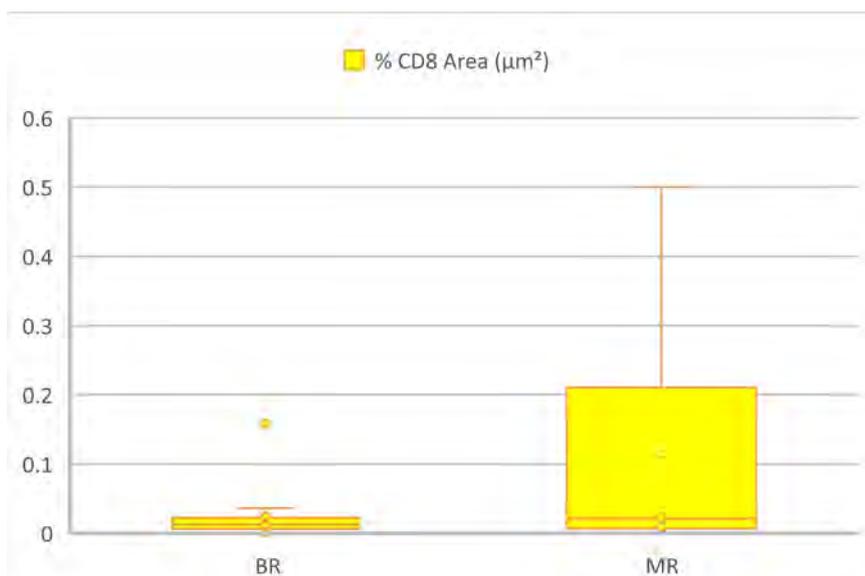


Figure 30 : Distribution en % de surface marquée par CD8+ sur la surface totale étudiée entre les zones de bonne réponse et de mauvaise réponse.

3. Répartition des populations macrophagiques CD163+ et/ou CD68+

D'après cette analyse, on observait une augmentation des populations macrophagiques dans les territoires de MR par rapport aux territoires de BR (Figure 31).

Dans les zones de BR, on observait un pourcentage de surface marquée équilibré représentant les macrophages CD163+/CD68- (moyenne de 0.3%) et les macrophages OCs (CD68+/CD163-) (moyenne de 0.3%). Cependant le pourcentage de surface marquée représentant les macrophages doublement positifs (CD68+/CD163+) était très minoritaire (moyenne de 0.05%).

Dans les zones de MR, on observait une assez large prédominance du pourcentage de surface marquée représentant les macrophages OCs (CD68+/CD163-) (moyenne 1.6 %). Les pourcentages de surface marquée qui montraient les macrophages de phénotype CD163+/CD68-

(moyenne 1.1 %) et les macrophages doublement positifs CD68+/CD163+ (moyenne 0.5 %) étaient minoritaires.

La différence d'infiltration concernant la population macrophagique OCs (CD68+/CD163-) présentait une différence significative ($p < 0.016$) entre les régions BR et MR.

Il n'a pas été observé de différence significative pour les surfaces marquées constituant les macrophages CD163+/CD68- ($p < 0.212$) et les macrophages doublement marquées (CD163+/CD68+) ($p < 0.141$).

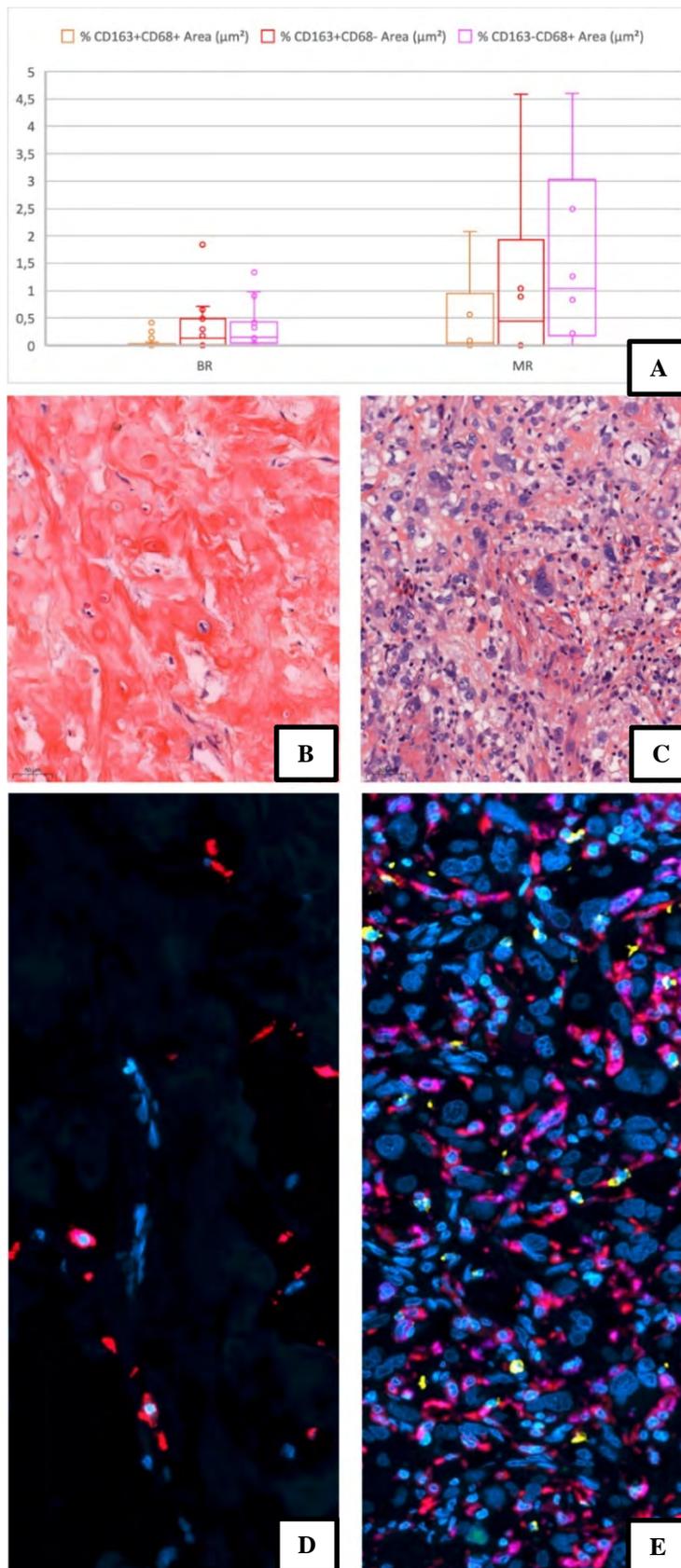


Figure 31 : Populations de macrophages, lymphocytes T cytotoxiques, et cellules ostéoblastiques étudiées par immunohistochimie multiplex sur pièces opératoires.
 (A) : Histogrammes représentant le pourcentage des différentes populations de macrophages dans les régions de BR (gauche) et MR (droite) ;
 (B) régions de BR (C) et de MR sur la coloration à l'HE ;
 (D) régions BR et (E) MR colorées en IF :
 CD68+CD163+ (rose), CD68-CD163+ (rouge), CD68+CD163- (violet) ; CD8+ (jaune) ; SATB2 (vert)

4. Répartition des vaisseaux SMA +

Nous n'avons observé aucune différence significative du pourcentage de surface marquée par l'anticorps anti-SMA entre les zones BR (moyenne 0.23%) et les zones MR (moyenne 0.23%) ($p < 0.772$) (Figure 32). Dans notre analyse, l'anticorps anti-SMA ne marquait que les parois de vaisseaux possédant une paroi vasculaire. Les vaisseaux issus de la néovascularisation tumorale sans muscle lisse dans leur paroi n'étaient pas marqués par cet anticorps.

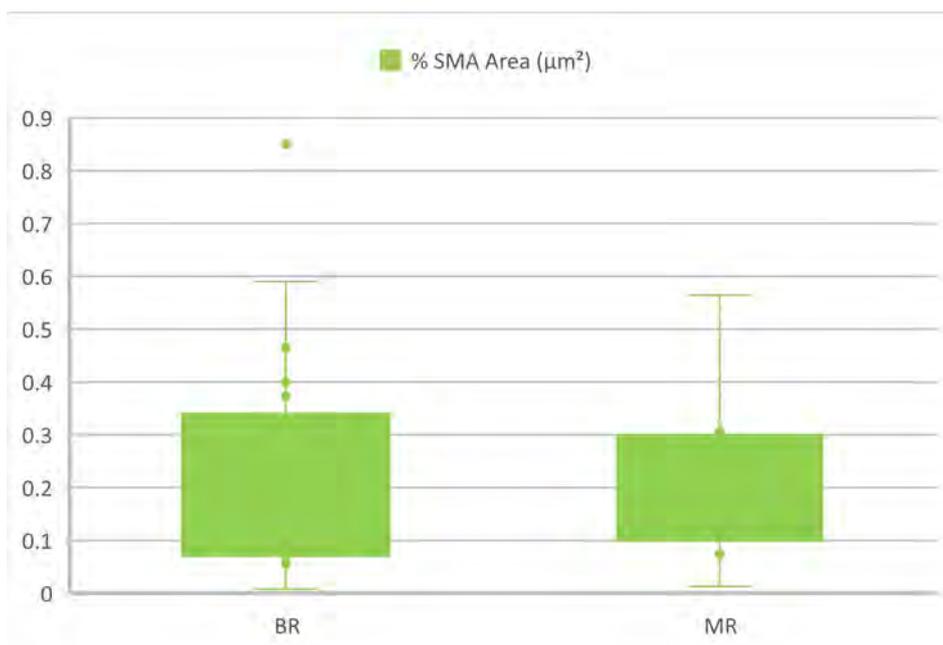


Figure 32 : Distribution en % de surface marquée par SMA+ sur la surface globale étudiée entre les zones de bonne réponse et de mauvaise réponse

V. DISCUSSION

L'objectif de ce travail a été de corréler la distribution spatiale des populations du microenvironnement immunitaire, par étude immunohistochimie multiplexe, avec l'imagerie TDM et IRM. Ainsi, en combinant les caractéristiques cliniques, histologiques et d'imagerie, nous espérons optimiser la stratification des patients pour une meilleure prise en charge thérapeutique.

1. **Distribution des cellules du microenvironnement par rapport aux territoires OM et CL sur biopsie**

Ce travail nous a permis de renforcer les résultats obtenus par analyse immunohistochimie multiplexe, que nous avons précédemment publiés (145) sur les biopsies de patients atteints d'OS. En effet nous avons confirmé que les OCs, marqués CD68+ étaient localisés dans les territoires cellulaires (CL), et que les macrophages CD163+ étaient la population largement majoritaire dans les territoires riches en matrice ostéoïde (OM). L'augmentation de notre cohorte à 30 cas a révélé que les taux de CD163 ne permettaient pas de différencier les zones CL des zones OM, et par conséquent que définir l'ostéocondensation sur les taux de CD163 n'était pas pertinent. Nous nous sommes de ce fait intéressés à l'étude du ratio CD163+/CD68+. Nous avons observé qu'il était différent de façon significative, entre les territoires CL et OM et que cette différence était corrélée à la présence des cellules CD68+. Nous avons aussi retrouvé que la population de cellules co-marquées CD163+/CD68+, avait une distribution différente par rapport à nos premiers résultats, significativement augmentée dans les territoires CL. Ces 2 constatations, soulignent que les OCs et les cellules co-marquées, potentiellement bipotentes, jouent certainement un rôle décisif dans la biologie de l'OS, comme précédemment rapporté dans la littérature (147).

En effet antérieurement, plusieurs études sur des modèles murins avaient mis en évidence le rôle délétère des OCs dans le développement des OS en montrant que la prolifération des cellules ostéosarcomateuses primitives et la survenue de métastases étaient réduites en traitant les animaux par des inhibiteurs puissants de la résorption ostéoclastique (60–64).

Le nombre de cellules marquées CD8 restait faible dans l'ensemble des territoires corroborant les données de la littérature. En effet, des études ont montré que les OS non seulement ne présentaient pas beaucoup d'infiltrat CD8+, mais aussi n'exprimaient que très peu le check point PD-1/PDL1 (55,99,100) expliquant les résultats décevants des immunothérapies dans cette pathologie (101,102).

La densité de cellules endothéliales (ERG+) était significativement plus importante dans les territoires CL par rapport aux territoires OM. Les études concernant la vascularisation dans les OS est très controversée. Une expression accrue du VEGF dans les OS est associé à un risque de métastases plus élevé et une survie plus faible (87), tandis qu'il est aussi associé à une bonne réponse thérapeutique contribuant à la pénétration des chimiothérapies dans la tumeur (88).

2. Corrélation entre les données microscopiques et d'imagerie sur biopsies

Ce travail nous a permis par ailleurs de développer des outils d'analyse pour définir au mieux l'ostéocondensation, à partir de la segmentation d'images TDM et IRM.

Pour évaluer le taux d'ostéocondensation tumorale à partir de l'imagerie initiale, nous avons utilisé 2 approches, une dite manuelle et l'autre par segmentation.

Par méthode manuelle, nous avons pu comparer le microenvironnement de 9 biopsies de patients avec leur imageries respectives (TDM+IRM). Nous avons constaté qu'il n'existait pas de corrélation, entre l'analyse du ratio CD163+/CD68+ sur la biopsie avec le taux d'ostéocondensation sur l'imagerie.

Par la méthode de segmentation, nous avons précisé le degré d'ostéocondensation et d'ostéolyse. Il est important de souligner que l'ostéolyse ne peut être caractérisée que dans les territoires osseux (intra médullaire spongieux et cortical). Elle correspond à priori à une zone riche en OCs, comme semble le prouver nos résultats sur microbiopsies, mais peut aussi correspondre à une zone cellulaire tumorale exclusive ou associée à d'autres cellules du microenvironnement. Cette méthode, par segmentation, plus innovante et moderne a cependant permis de mieux apprécier les volumes de la tumeur et donc l'étendue de l'ostéocondensation, par rapport à la méthode manuelle. La comparaison du résultat final entre les 2 approches étaient similaires, rendant possible l'utilisation de la méthode manuelle pour définir le degré d'OCD d'un OS. Ces résultats devront être validés sur une cohorte plus importante. Nous avons renoncé à utiliser une approche par radiomique, qui n'apportait pas d'informations utiles pour répondre à notre question (définir le caractère OCD et OL).

Cette méthode par segmentation n'est utilisée qu'en recherche car très chronophage et main d'œuvre dépendante, mais permet de valider l'approche manuelle, même si elle semble grossière.

Une perspective pour mieux caractériser l'implication des cellules CD68, serait de coupler l'imagerie IRM/TDM à un traceur CD68. Les travaux effectués (143,144) avec le ferumoxytol,

supplément de fer qui peut être utilisé comme agent de contraste, et phagocyté par les TAMs et détectable par l'IRM, ouvre des perspectives prometteuses, mais ne permettent pas encore de différencier les sous populations macrophagiques.

Limites et perspectives d'étude sur les biopsies et l'imagerie :

Le principal biais est lié au fait que la biopsie est effectuée de préférence dans les territoires ostéolytiques repérés par l'imagerie, et de fait ne peut pas être dans ces tumeurs connues comme étant très hétérogènes, représentative des différents contingents et des territoires ostéocondensant non prélevés du fait de leur dureté.

Pour dépasser les limites de la microbiopsie, ou de la biopsie chirurgicale, nous proposons d'étudier à l'avenir la distribution du microenvironnement immunitaire sur pièces opératoires, et de corrélérer cette distribution à l'imagerie de la tumeur avant chirurgie, et non avant la biopsie chirurgicale. Les protocoles actuels dans l'étude des ostéosarcomes ne comprennent pas de TDM avant la chirurgie, seule technique radiologique qui permettrait de visualiser au mieux l'ostéocondensation. Pour permettre ce travail, et contourner le problème de l'irradiation du patient par des examens complémentaires inutiles dans le suivi de l'évolution de la réponse à la chimiothérapie par imagerie (actuellement réalisée par l'IRM), nous proposons d'effectuer un TDM de la coupe histologique que nous pourrons ensuite corrélérer à la coupe analysée pour histologie conventionnelle et en immunohistochimie.

Pour approfondir la quantification de l'ostéocondensation et mieux la caractériser dans son architecture et densité, nous proposons d'effectuer de la microtomographie à rayons X, qui permet d'avoir une résolution de 8 Micromètres, bien plus élevée que celle des TDM utilisés en clinique. Cette technique sera capable de différencier l'os préexistant détruit par la tumeur, de l'os néoformé tumoral. Cette imagerie d'échelle intermédiaire entre le scanner et l'histologie, permettra aussi de mieux caractériser la distribution spatiale des cellules tumorales et du microenvironnement par rapport à l'os (acquisition de matériel de résolution submicrométrique en cours à l'IMFT, Fédération FERMAT).

Un autre écueil de l'analyse du microenvironnement sur biopsie est d'être l'analyse du microenvironnement à un instant donné. Par l'analyse sur pièce opératoire, nous espérons, par l'étude des populations du microenvironnement dans les zones de réponse « partielle » au traitement par chimiothérapie, mieux comprendre la dynamique spatio-temporelle des populations cellulaires.

3. Distribution spatiale du microenvironnement sur pièces opératoires

Le but de ce travail préliminaire était, en étudiant la distribution spatiale des cellules du microenvironnement, de montrer des différences entre les zones de BR et de MR, et définir à partir du microenvironnement immunitaire une signature de résistance au traitement. Il s'agissait aussi de créer une collection avec le couple biopsie/pièces opératoires.

Nous avons constaté qu'il existait uniquement une différence sur les taux d'OCs présents de façon significativement plus importante dans les territoires de MR, montrant là aussi une implication des OCs dans la résistance au traitement. La distribution de CD8 et CD163, n'était significativement pas différente entre les territoires de BR et MR.

Ces résultats préliminaires ouvrent de nouvelles perspectives de travail que nous réaliserons dans un nouveau projet à partir de prélèvements congelés issus de pièces opératoires.

Tout d'abord par des techniques différentes (RNAseq Bulk, spatial transcriptomiques ...) nous rechercherons s'il existe une expression différentielle des gènes au niveau des cellules tumorales viables et du microenvironnement, en fonction des zones de MR et BR. Nous espérons ainsi trouver de nouvelles cibles thérapeutiques en lien avec le microenvironnement immunitaire et/ou vasculaire, et mieux comprendre la résistance des OS aux différentes thérapeutiques. En stratifiant mieux les patients, nous pourrions proposer chez les patients MR de nouvelles thérapies, en fonction du microenvironnement persistant, par exemple.

Que ce soit dans les biopsies et les pièces opératoires, nous avons constaté que ce sont les cellules marquées CD68, dont les OCs qui semblaient jouer un rôle déterminant dans la physiopathologie des OS. Une nouvelle perspective serait de progresser dans la caractérisation de l'ostéolyse au sens général et de la caractérisation de la tumeur dans les tissus mous (d'un point de vue microscopique et en imagerie), quand elle n'est pas ostéocondensante.

D'autres perspectives seront d'étudier comme la distribution des cellules du microenvironnement par rapport à la localisation de la tumeur sur l'os (corticale ou intramédullaire et dans les tissus mous). Et enfin par ces nouvelles approches moléculaires avec l'analyse de la distribution spatiale de mieux comprendre les interactions entre les cellules tumorales et le microenvironnement dans le contexte de la réponse au traitement.

VI. CONCLUSION

L'objectif de ce travail a été : 1) de corrélérer la distribution spatiale des populations du microenvironnement immunitaire, en relation avec l'os (OM), sur biopsies de patients atteints d'ostéosarcome (OS), par étude immunohistochimie multiplexe, avec l'imagerie TDM et IRM. Pour caractériser le caractère ostéocondensant (OCD) et ostéolytique (OL) de la tumeur sur l'imagerie, nous avons utilisé une approche manuelle et par segmentation, en utilisant une succession d'algorithmes mathématiques. Ainsi, en combinant les caractéristiques cliniques, histologiques et d'imagerie, nous espérons optimiser la stratification des patients pour une meilleure prise en charge thérapeutique ; 2) d'étudier la distribution spatiale des cellules du microenvironnement sur les pièces opératoires obtenues après chimiothérapie pour trouver des différences de répartition entre les zones de bonne réponse (BR) et les zones de mauvaises réponse (MR) et définir à partir du microenvironnement immunitaire une signature de résistance au traitement.

Sur biopsies, nous avons montré que le ratio CD163+/CD68+ était significativement différent, entre les territoires CL et OM et que cette différence était corrélée à la présence des cellules CD68+, associée à un plus mauvais pronostic. Nous avons aussi retrouvé que la population de cellules co-marquées CD163+/CD68+, était significativement augmentée dans les territoires CL, soulignant que les OCs et les cellules co-marquées, potentiellement bipotentes, jouent certainement un rôle décisif dans la biologie de l'OS. Les lymphocytes T cytotoxiques étaient très peu représentés comme observé dans d'autres études et expliquent le peu d'impact des immunothérapies visant les checks points lymphocytaires.

Nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre les populations du microenvironnement et l'aspect en imagerie, montrant la non-pertinence d'essayer de faire des corrélations entre des fragments de tumeurs hétérogènes et l'imagerie représentative de l'ensemble du volume de la tumeur.

Sur pièces opératoires, nous avons constaté qu'il existait uniquement une différence sur les taux d'OCs présents de façon significativement plus importante dans les territoires de MR, montrant là aussi une implication des OCs dans la résistance de la réponse au traitement.

L'ensemble de ces résultats souligne l'importance du rôle des cellules CD68+ et des cellules potentiellement bipotentes CD163+/CD68+ dans le pronostic et la réponse au traitement des OS, et ouvre de nouvelles perspectives de recherche à faire sur pièces opératoires, pour comprendre la biologie de l'OS et sa réponse aux traitements (approches moléculaires innovantes, RNAseq, spatial transcriptomic).

Professeur Pierre BROUSSET
Département de Pathologie
Institut Universitaire du Cancer
Toulouse Oncopôle
1, av. Irène Joliot-Curie - 31059 Toulouse cedex 88
Tél. 05 31 15 61 41

Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
de Médecine Toulouse - Purpan

Didier CARRIÉ

VII. BIBLIOGRAPHIE

1. Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res.* 2009;152:3-13.
2. Lacour B, Guyot-Goubin A, Guissou S, Bellec S, Désandes E, Clavel J. Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000-2004. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP.* mai 2010;19(3):173-81.
3. Valery PC, Laversanne M, Bray F. Bone cancer incidence by morphological subtype: a global assessment. *Cancer Causes Control CCC.* août 2015;26(8):1127-39.
4. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004. *Cancer.* 2009;115(7):1531-43.
5. Whelan J, McTiernan A, Cooper N, Wong YK, Francis M, Vernon S, et al. Incidence and survival of malignant bone sarcomas in England 1979-2007. *Int J Cancer.* 15 août 2012;131(4):E508-517.
6. Kager L, Zoubek A, Dominkus M, Lang S, Bodmer N, Jundt G, et al. Osteosarcoma in very young children: experience of the Cooperative Osteosarcoma Study Group. *Cancer.* 15 nov 2010;116(22):5316-24.
7. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int J Cancer.* 1 juill 2009;125(1):229-34.
8. Huvos AG. Osteogenic sarcoma of bones and soft tissues in older persons. A clinicopathologic analysis of 117 patients older than 60 years. *Cancer.* 1 avr 1986;57(7):1442-9.
9. Durfee RA, Mohammed M, Luu HH. Review of Osteosarcoma and Current Management. *Rheumatol Ther.* 19 oct 2016;3(2):221-43.
10. Fletcher CDM, Weltgesundheitsorganisation, International Agency for Research on Cancer, éditeurs. WHO classification of tumours of soft tissue and bone: this book reflects the views of a working group that convened for a consensus and editorial meeting at the University of Zurich, Switzerland, 18 - 20 April 2012. 4. ed. Lyon: Internat. Agency for Research on Cancer; 2013. 468 p. (World Health Organization classification of tumours).
11. Scully SP, Ghert MA, Zurakowski D, Thompson RC, Gebhardt MC. Pathologic fracture in osteosarcoma : prognostic importance and treatment implications. *J Bone Joint Surg Am.* janv 2002;84(1):49-57.
12. Nakajima H, Sim FH, Bond JR, Unni KK. Small cell osteosarcoma of bone. Review of 72 cases. *Cancer.* 1 juin 1997;79(11):2095-106.
13. Angelini A, Mavrogenis AF, Trovarelli G, Ferrari S, Picci P, Ruggieri P. Telangiectatic osteosarcoma: a review of 87 cases. *J Cancer Res Clin Oncol.* oct 2016;142(10):2197-207.
14. Dadia S, Grimer R. Characteristics, diagnosis and treatment of bone and soft tissue sarcomas. *Br J Hosp Med Lond Engl* 2005. nov 2007;68(11):589-93.
15. Bertin H, Gomez-Brouchet A, Rédini F. Osteosarcoma of the jaws: An overview of the pathophysiological mechanisms. *Crit Rev Oncol Hematol.* 10 oct 2020;156:103126.

16. Hasegawa T, Hirose T, Kudo E, Hizawa K, Usui M, Ishii S. Immunophenotypic heterogeneity in osteosarcomas. *Hum Pathol.* 1 juin 1991;22(6):583-90.
17. Fanburg JC, Rosenberg AE, Weaver DL, Leslie KO, Mann KG, Taatjes DJ, et al. Osteocalcin and osteonectin immunoreactivity in the diagnosis of osteosarcoma. *Am J Clin Pathol.* oct 1997;108(4):464-73.
18. Davis JL, Horvai AE. Special AT-rich sequence-binding protein 2 (SATB2) expression is sensitive but may not be specific for osteosarcoma as compared with other high-grade primary bone sarcomas. *Histopathology.* 2016;69(1):84-90.
19. Mirabello L, Pfeiffer R, Murphy G, Daw NC, Patiño-Garcia A, Troisi RJ, et al. Height at diagnosis and birth-weight as risk factors for osteosarcoma. *Cancer Causes Control CCC.* juin 2011;22(6):899-908.
20. Ruijs MWG, Verhoef S, Rookus MA, Pruntel R, van der Hout AH, Hogervorst FBL, et al. TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. *J Med Genet.* juin 2010;47(6):421-8.
21. Hansen MF, Koufos A, Gallie BL, Phillips RA, Fodstad O, Brøgger A, et al. Osteosarcoma and retinoblastoma: a shared chromosomal mechanism revealing recessive predisposition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* sept 1985;82(18):6216-20.
22. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer.* nov 2001;1(2):157-62.
23. Marees T, Moll AC, Imhof SM, de Boer MR, Ringens PJ, van Leeuwen FE. Risk of second malignancies in survivors of retinoblastoma: more than 40 years of follow-up. *J Natl Cancer Inst.* 17 déc 2008;100(24):1771-9.
24. Risk of new cancers after radiotherapy in long-term survivors of retinoblastoma: an extended follow-up - PubMed [Internet]. [cité 17 juin 2021]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15800318/>
25. Cobrinik D, Whyte P, Peeper DS, Jacks T, Weinberg RA. Cell cycle-specific association of E2F with the p130 E1A-binding protein. *Genes Dev.* déc 1993;7(12A):2392-404.
26. Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon DJ, Ciocci S, et al. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell.* 17 nov 1995;83(4):655-66.
27. German J. Bloom's syndrome. XX. The first 100 cancers. *Cancer Genet Cytogenet.* janv 1997;93(1):100-6.
28. Goto M, Miller RW, Ishikawa Y, Sugano H. Excess of rare cancers in Werner syndrome (adult progeria). *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* avr 1996;5(4):239-46.
29. Gianferante DM, Mirabello L, Savage SA. Germline and somatic genetics of osteosarcoma — connecting aetiology, biology and therapy. *Nat Rev Endocrinol.* août 2017;13(8):480-91.

30. Behjati S, Tarpey PS, Haase K, Ye H, Young MD, Alexandrov LB, et al. Recurrent mutation of IGF signalling genes and distinct patterns of genomic rearrangement in osteosarcoma. *Nat Commun.* 23 juin 2017;8:15936.
31. Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma - PubMed [Internet]. [cité 25 mai 2021]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24703847/>
32. Squire JA, Pei J, Marrano P, Beheshti B, Bayani J, Lim G, et al. High-resolution mapping of amplifications and deletions in pediatric osteosarcoma by use of CGH analysis of cDNA microarrays. *Genes Chromosomes Cancer.* nov 2003;38(3):215-25.
33. Kovac M, Blattmann C, Ribí S, Smida J, Mueller NS, Engert F, et al. Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency. *Nat Commun.* 3 déc 2015;6:8940.
34. Link MP, Goorin AM, Miser AW, Green AA, Pratt CB, Belasco JB, et al. The Effect of Adjuvant Chemotherapy on Relapse-Free Survival in Patients with Osteosarcoma of the Extremity. *N Engl J Med.* 19 juin 1986;314(25):1600-6.
35. Casali PG, Bielack S, Abecassis N, Aro HT, Bauer S, Biagini R, et al. Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 01 2018;29(Suppl 4):iv79-95.
36. Deley M-CL, Guinebretière J-M, Gentet J-C, Pacquement H, Pichon F, Marec-Bérard P, et al. SFOP OS94: A randomised trial comparing preoperative high-dose methotrexate plus doxorubicin to high-dose methotrexate plus etoposide and ifosfamide in osteosarcoma patients. *Eur J Cancer.* 1 mars 2007;43(4):752-61.
37. Assi H, Missenard G, Terrier P, Le Pechoux C, Bonvalot S, Vanel D, et al. Intensive Induction Chemotherapy without Methotrexate in Adult Patients with Localized Osteosarcoma: Results of the Institut Gustave-Roussy Phase II Trial. *Curr Oncol.* nov 2010;17(6):23-31.
38. Piperno-Neumann S, Le Deley M-C, Rédini F, Pacquement H, Marec-Bérard P, Petit P, et al. Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* août 2016;17(8):1070-80.
39. Brard C, Piperno-Neumann S, Delaye J, Hampson L, Le Teuff G, Deley M-C, et al. Sarcome-13/OS2016 trial protocol: A multicentre, randomised, open-label, phase II trial of mifamurtide combined with postoperative chemotherapy for patients with newly diagnosed high-risk osteosarcoma. *BMJ Open.* 1 mai 2019;9:e025877.
40. Gomez-Brouchet A, Mascard E, Siegfried A, de Pinieux G, Gaspar N, Bouvier C, et al. Évaluation des marges de résection des sarcomes osseux traités par chimiothérapie néoadjuvante : revue de la littérature et recommandations du Groupe OS (GROUPOS) du Groupe Sarcome français et du Groupe d'étude des tumeurs osseuses (GSF-GETO/RESOS). *Rev Chir Orthopédique Traumatol.* juin 2019;105(4):518-27.
41. Bramer J a. M, Abudu AA, Grimer RJ, Carter SR, Tillman RM. Do pathological fractures influence survival and local recurrence rate in bony sarcomas? *Eur J Cancer.* 1 sept 2007;43(13):1944-51.

42. Gomez-Brouchet A, Bouvier C, Decouvelaere A-V, Larousserie F, Aubert S, Leroy X, et al. [Place of the pathologist in the management of primary bone tumors (osteosarcoma and Ewing's family tumors after neoadjuvant treatment)]. *Ann Pathol.* déc 2011;31(6):455-65.
43. Benezech S, Chabaud S, Chambon F, Dijoud F, Chotel F, Marec-Berard P. Prognostic Value of Vascular Invasion in Pediatric Osteosarcomas. *Pathol Oncol Res POR.* oct 2016;22(4):847-52.
44. Rosen G, Marcove RC, Caparros B, Nirenberg A, Kosloff C, Huvos AG. Primary osteogenic sarcoma: the rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery. *Cancer.* juin 1979;43(6):2163-77.
45. Rosen G, Caparros B, Huvos AG, Kosloff C, Nirenberg A, Cacavio A, et al. Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. *Cancer.* 15 mars 1982;49(6):1221-30.
46. Ozaki T, Flege S, Kevric M, Lindner N, Maas R, Delling G, et al. Osteosarcoma of the pelvis: experience of the Cooperative Osteosarcoma Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 15 janv 2003;21(2):334-41.
47. Mehta N, Selch M, Wang P-C, Federman N, Lee JM, Eilber FC, et al. Safety and efficacy of stereotactic body radiation therapy in the treatment of pulmonary metastases from high grade sarcoma. *Sarcoma.* 2013;2013:360214.
48. Ando K, Heymann M-F, Stresing V, Mori K, Rédini F, Heymann D. Current Therapeutic Strategies and Novel Approaches in Osteosarcoma. *Cancers.* 24 mai 2013;5(2):591-616.
49. Duchman KR, Gao Y, Miller BJ. Prognostic factors for survival in patients with high-grade osteosarcoma using the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program database. *Cancer Epidemiol.* 1 août 2015;39(4):593-9.
50. Factors predicting survival following complete surgical remission of pulmonary metastasis in osteosarcoma [Internet]. [cité 7 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mco.2014.426>
51. Bernthal NM, Federman N, Eilber FR, Nelson SD, Eckardt JJ, Eilber FC, et al. Long-term results (>25 years) of a randomized, prospective clinical trial evaluating chemotherapy in patients with high-grade, operable osteosarcoma. *Cancer.* 2012;118(23):5888-93.
52. Xin S, Wei G. Prognostic factors in osteosarcoma: A study level meta-analysis and systematic review of current practice. *J Bone Oncol.* avr 2020;21:100281.
53. Jeys LM, Thorne CJ, Parry M, Gaston CLL, Sumathi VP, Grimer JR. A Novel System for the Surgical Staging of Primary High-grade Osteosarcoma: The Birmingham Classification. *Clin Orthop.* mars 2017;475(3):842-50.
54. Yedururi S, Chawla S, Amini B, Wei W, Salem UI, Morani AC, et al. Tumor thrombus in the large veins draining primary pelvic osteosarcoma on cross sectional imaging. *Eur J Radiol.* août 2018;105:49-55.
55. Gomez-Brouchet A, Illac C, Gilhodes J, Bouvier C, Aubert S, Guinebretiere J-M, et al. CD163-positive tumor-associated macrophages and CD8-positive cytotoxic lymphocytes are powerful diagnostic markers for the therapeutic stratification of osteosarcoma patients:

- An immunohistochemical analysis of the biopsies from the French OS2006 phase 3 trial. *Oncoimmunology*. 2017;6(9):e1331193.
56. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 20 mars 2012;21(3):309-22.
 57. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. nov 2013;19(11):1423-37.
 58. Verrecchia F, Rédini F. Transforming Growth Factor- β Signaling Plays a Pivotal Role in the Interplay Between Osteosarcoma Cells and Their Microenvironment. *Front Oncol*. 30 avr 2018;8:133.
 59. Lamoureux F, Richard P, Wittrant Y, Battaglia S, Pilet P, Trichet V, et al. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res*. 1 août 2007;67(15):7308-18.
 60. Heymann D, Fortun Y, Rédini F, Padrines M. Osteolytic bone diseases: physiological analogues of bone resorption effectors as alternative therapeutic tools. *Drug Discov Today*. 15 févr 2005;10(4):242-7.
 61. Ory B, Heymann M-F, Kamijo A, Gouin F, Heymann D, Redini F. Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer*. 1 déc 2005;104(11):2522-9.
 62. Heymann D, Ory B, Blanchard F, Heymann M-F, Coipeau P, Charrier C, et al. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone*. juill 2005;37(1):74-86.
 63. Ohba T, Cole HA, Cates JMM, Slosky DA, Haro H, Ando T, et al. Bisphosphonates inhibit osteosarcoma-mediated osteolysis via attenuation of tumor expression of MCP-1 and RANKL. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. juin 2014;29(6):1431-45.
 64. Costa-Rodrigues J, Fernandes A, Fernandes MH. Reciprocal osteoblastic and osteoclastic modulation in co-cultured MG63 osteosarcoma cells and human osteoclast precursors. *J Cell Biochem*. déc 2011;112(12):3704-13.
 65. Cathomas R, Rothermundt C, Bode B, Fuchs B, von Moos R, Schwitter M. RANK ligand blockade with denosumab in combination with sorafenib in chemorefractory osteosarcoma: a possible step forward? *Oncology*. 2015;88(4):257-60.
 66. Punzo F, Tortora C, Argenziano M, Pinto DD, Pota E, Martino MD, et al. Can Denosumab be used in combination with Doxorubicin in Osteosarcoma? *Oncotarget*. 14 juill 2020;11(28):2763-73.
 67. Transcription factors controlling osteoblastogenesis - PubMed [Internet]. [cité 8 juill 2021]. Disponible sur: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/18331818/>
 68. Fakhry M, Hamade E, Badran B, Buchet R, Magne D. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J Stem Cells*. 26 oct 2013;5(4):136-48.

69. Wang J-Y, Wu P-K, Chen PC-H, Lee C-W, Chen W-M, Hung S-C. Generation of Osteosarcomas from a Combination of Rb Silencing and c-Myc Overexpression in Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Transl Med.* févr 2017;6(2):512-26.
70. Rubio R, Gutierrez-Aranda I, Sáez-Castillo AI, Labarga A, Rosu-Myles M, Gonzalez-Garcia S, et al. The differentiation stage of p53-Rb-deficient bone marrow mesenchymal stem cells imposes the phenotype of in vivo sarcoma development. *Oncogene.* 10 oct 2013;32(41):4970-80.
71. Rubio R, Abarrategi A, Garcia-Castro J, Martinez-Cruzado L, Suarez C, Tornin J, et al. Bone environment is essential for osteosarcoma development from transformed mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio.* mai 2014;32(5):1136-48.
72. Lin L, Huang K, Guo W, Zhou C, Wang G, Zhao Q. Conditioned medium of the osteosarcoma cell line U2OS induces hBMSCs to exhibit characteristics of carcinoma-associated fibroblasts via activation of IL-6/STAT3 signalling. *J Biochem (Tokyo).* 1 sept 2020;168(3):265-71.
73. Cai R, Kawazoe N, Chen G. Influence of surfaces modified with biomimetic extracellular matrices on adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells and osteosarcoma cells. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 févr 2015;126:381-6.
74. Lagerweij T, Pérez-Lanzón M, Baglio SR. A Preclinical Mouse Model of Osteosarcoma to Define the Extracellular Vesicle-mediated Communication Between Tumor and Mesenchymal Stem Cells. *J Vis Exp JoVE.* 6 mai 2018;(135).
75. Han Y, Wu C, Wang J, Liu N. CXCR7 maintains osteosarcoma invasion after CXCR4 suppression in bone marrow microenvironment. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* mai 2017;39(5):1010428317701631.
76. Pietrovito L, Leo A, Gori V, Lulli M, Parri M, Becherucci V, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote invasiveness and transendothelial migration of osteosarcoma cells via a mesenchymal to amoeboid transition. *Mol Oncol.* mai 2018;12(5):659-76.
77. Perut F, Roncuzzi L, Baldini N. The Emerging Roles of Extracellular Vesicles in Osteosarcoma. *Front Oncol.* 2019;9:1342.
78. Du L, Han X, Tu B, Wang M, Qiao H, Zhang S, et al. CXCR1/Akt signaling activation induced by mesenchymal stem cell-derived IL-8 promotes osteosarcoma cell anoikis resistance and pulmonary metastasis. *Cell Death Dis.* 18 juin 2018;9(7):1-11.
79. Tu B, Zhu J, Liu S, Wang L, Fan Q, Hao Y, et al. Mesenchymal stem cells promote osteosarcoma cell survival and drug resistance through activation of STAT3. *Oncotarget.* 22 juin 2016;7(30):48296-308.
80. Kinoshita T, Yip KW, Spence T, Liu F-F. MicroRNAs in extracellular vesicles: potential cancer biomarkers. *J Hum Genet.* janv 2017;62(1):67-74.
81. Qiao B, Shui W, Cai L, Guo S, Jiang D. Human mesenchymal stem cells as delivery of osteoprotegerin gene: homing and therapeutic effect for osteosarcoma. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:969-76.

82. Baglio SR, Lagerweij T, Pérez-Lanzón M, Ho XD, Léveillé N, Melo SA, et al. Blocking Tumor-Educated MSC Paracrine Activity Halts Osteosarcoma Progression. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 juill 2017;23(14):3721-33.
83. Wiklander OPB, Brennan MÁ, Lötvall J, Breakefield XO, El Andaloussi S. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Sci Transl Med.* 15 mai 2019;11(492):eaav8521.
84. Qin F, Tang H, Zhang Y, Zhang Z, Huang P, Zhu J. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-208a promotes osteosarcoma cell proliferation, migration, and invasion. *J Cell Physiol.* mai 2020;235(5):4734-45.
85. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 19 mai 2011;473(7347):298-307.
86. Li Y-S, Liu Q, Tian J, He H-B, Luo W. Angiogenesis Process in Osteosarcoma: An Updated Perspective of Pathophysiology and Therapeutics. *Am J Med Sci.* avr 2019;357(4):280-8.
87. Yu X-W, Wu T-Y, Yi X, Ren W-P, Zhou Z, Sun Y, et al. Prognostic significance of VEGF expression in osteosarcoma: a meta-analysis. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* janv 2014;35(1):155-60.
88. Qu Y, Xu J, Jiang T, Zhao H, Gao Y, Zheng C, et al. Difference in pre- and postchemotherapy vascular endothelial growth factor levels as a prognostic indicator in osteosarcoma. *J Int Med Res.* 2011;39(4):1474-82.
89. Navid F, Santana VM, Neel M, McCarville MB, Shulkin BL, Wu J, et al. A phase II trial evaluating the feasibility of adding bevacizumab to standard osteosarcoma therapy. *Int J Cancer.* 1 oct 2017;141(7):1469-77.
90. Grignani G, Palmerini E, Dileo P, Asaferi SD, D'Ambrosio L, Pignochino Y, et al. A phase II trial of sorafenib in relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma after failure of standard multimodal therapy: an Italian Sarcoma Group study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* févr 2012;23(2):508-16.
91. Inagaki Y, Hookway E, Williams KA, Hassan AB, Oppermann U, Tanaka Y, et al. Dendritic and mast cell involvement in the inflammatory response to primary malignant bone tumours. *Clin Sarcoma Res.* 1 août 2016;6(1):13.
92. Heymann M-F, Lézot F, Heymann D. The contribution of immune infiltrates and the local microenvironment in the pathogenesis of osteosarcoma. *Cell Immunol.* 1 sept 2019;343:103711.
93. Majzner RG, Simon JS, Grosso JF, Martinez D, Pawel BR, Santi M, et al. Assessment of programmed death-ligand 1 expression and tumor-associated immune cells in pediatric cancer tissues. *Cancer.* 1 oct 2017;123(19):3807-15.
94. Alvarez C, Monasterio G, Cavalla F, Córdova LA, Hernández M, Heymann D, et al. Osteoimmunology of Oral and Maxillofacial Diseases: Translational Applications Based on Biological Mechanisms. *Front Immunol.* 2019;10:1664.
95. Koirala P, Roth ME, Gill J, Piperdi S, Chinai JM, Geller DS, et al. Immune infiltration and PD-L1 expression in the tumor microenvironment are prognostic in osteosarcoma. *Sci Rep*

- [Internet]. 26 juill 2016 [cité 12 mai 2020];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4960483/>
96. Zhang C, Zheng J-H, Lin Z-H, Lv H-Y, Ye Z-M, Chen Y-P, et al. Profiles of immune cell infiltration and immune-related genes in the tumor microenvironment of osteosarcoma. *Ag-ing*. 9 févr 2020;12(4):3486-501.
 97. Huang X, Zhang W, Zhang Z, Shi D, Wu F, Zhong B, et al. Prognostic Value of Programmed Cell Death 1 Ligand-1 (PD-L1) or PD-1 Expression in Patients with Osteosarcoma: A Meta-Analysis. *J Cancer*. 2018;9(14):2525-31.
 98. Zhu Z, Jin Z, Zhang M, Tang Y, Yang G, Yuan X, et al. Prognostic value of programmed death-ligand 1 in sarcoma: a meta-analysis. *Oncotarget*. 11 juill 2017;8(35):59570-80.
 99. van Erp AEM, Versleijen-Jonkers YMH, Hillebrandt-Roeffen MHS, van Houdt L, Gorris MAJ, van Dam LS, et al. Expression and clinical association of programmed cell death-1, programmed death-ligand-1 and CD8+ lymphocytes in primary sarcomas is subtype dependent. *Oncotarget*. 7 juill 2017;8(41):71371-84.
 100. Palmerini E, Agostinelli C, Picci P, Pileri S, Marafioti T, Lollini P-L, et al. Tumoral immune-infiltrate (IF), PD-L1 expression and role of CD8/TIA-1 lymphocytes in localized osteosarcoma patients treated within protocol ISG-OS1. *Oncotarget*. 4 déc 2017;8(67):111836-46.
 101. Tawbi HA, Burgess M, Bolejack V, Van Tine BA, Schuetze SM, Hu J, et al. Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. nov 2017;18(11):1493-501.
 102. Le Cesne A, Marec-Berard P, Blay J-Y, Gaspar N, Bertucci F, Penel N, et al. Programmed cell death 1 (PD-1) targeting in patients with advanced osteosarcomas: results from the PEMBROSARC study. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. sept 2019;119:151-7.
 103. Merchant MS, Wright M, Baird K, Wexler LH, Rodriguez-Galindo C, Bernstein D, et al. Phase 1 Clinical Trial of Ipilimumab In Pediatric Patients With Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 mars 2016;22(6):1364-70.
 104. Lussier DM, Johnson JL, Hingorani P, Blattman JN. Combination immunotherapy with α -CTLA-4 and α -PD-L1 antibody blockade prevents immune escape and leads to complete control of metastatic osteosarcoma. *J Immunother Cancer*. 19 mai 2015;3:21.
 105. Deshmukh SK. CTLA-4 and PD-L1/PD-1 Pathways: Immune Checkpoint Inhibitors and Cancer Immunotherapy. *J Cancer Immunol* [Internet]. 21 févr 2020 [cité 23 août 2021];2(1). Disponible sur: <https://www.scientificarchives.com/article/#>
 106. Thanindratarn P, Dean DC, Nelson SD, Hornicek FJ, Duan Z. Advances in immune checkpoint inhibitors for bone sarcoma therapy. *J Bone Oncol*. 1 avr 2019;15:100221.
 107. Buddingh EP, Kuijjer ML, Duim RAJ, Bürger H, Agelopoulos K, Myklebost O, et al. Tumor-infiltrating macrophages are associated with metastasis suppression in high-grade osteosarcoma: a rationale for treatment with macrophage activating agents. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 avr 2011;17(8):2110-9.

108. Dumars C, Ngyuen J-M, Gaultier A, Lanel R, Corradini N, Gouin F, et al. Dysregulation of macrophage polarization is associated with the metastatic process in osteosarcoma. *Oncotarget*. 13 nov 2016;7(48):78343-54.
109. Kelleher FC, O'Sullivan H. Monocytes, Macrophages, and Osteoclasts in Osteosarcoma. *J Adolesc Young Adult Oncol*. 1 sept 2017;6(3):396-405.
110. Dancsok AR, Gao D, Lee AF, Steigen SE, Blay J-Y, Thomas DM, et al. Tumor-associated macrophages and macrophage-related immune checkpoint expression in sarcomas. *OncoImmunology*. 1 janv 2020;9(1):1747340.
111. Gide TN, Wilmott JS, Scolyer RA, Long GV. Primary and Acquired Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 mars 2018;24(6):1260-70.
112. Proff P, Römer P. The molecular mechanism behind bone remodelling: a review. *Clin Oral Investig*. 1 déc 2009;13(4):355-62.
113. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 15 mai 2003;423(6937):337-42.
114. Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage Polarisation: an Immunohistochemical Approach for Identifying M1 and M2 Macrophages. *PLOS ONE*. 15 nov 2013;8(11):e80908.
115. Schmieder A, Michel J, Schönhaar K, Goerdts S, Schledzewski K. Differentiation and gene expression profile of tumor-associated macrophages. *Semin Cancer Biol*. août 2012;22(4):289-97.
116. Guerriero JL. Macrophages: The Road Less Traveled, Changing Anticancer Therapy. *Trends Mol Med*. 1 mai 2018;24(5):472-89.
117. Han Y, Guo W, Ren T, Huang Y, Wang S, Liu K, et al. Tumor-associated macrophages promote lung metastasis and induce epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma by activating the COX-2/STAT3 axis. *Cancer Lett*. janv 2019;440-441:116-25.
118. Cheng Z, Wang L, Wu C, Huang L, Ruan Y, Xue W. Tumor-derived Exosomes Induced M2 Macrophage Polarization and Promoted the Metastasis of Osteosarcoma Cells Through Tim-3. *Arch Med Res*. févr 2021;52(2):200-10.
119. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins | *Blood* | American Society of Hematology [Internet]. [cité 20 juill 2021]. Disponible sur: <https://ashpublications.org/blood/article/81/6/1607/170074/Molecular-cloning-of-CD68-a-human-macrophage>
120. Lau SK, Chu PG, Weiss LM. CD163: A Specific Marker of Macrophages in Paraffin-Embedded Tissue Samples. *Am J Clin Pathol*. 1 nov 2004;122(5):794-801.
121. Zhou Y, Yang D, Yang Q, Lv X, Huang W, Zhou Z, et al. Single-cell RNA landscape of intratumoral heterogeneity and immunosuppressive microenvironment in advanced osteosarcoma. *Nat Commun*. 10 déc 2020;11(1):6322.
122. Shaikh AB, Li F, Li M, He B, He X, Chen G, et al. Present Advances and Future Perspectives of Molecular Targeted Therapy for Osteosarcoma. *Int J Mol Sci* [Internet]. 6 avr

2016 [cité 17 mai 2021];17(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848962/>

123. Meyers PA, Schwartz CL, Krailo MD, Healey JH, Bernstein ML, Betcher D, et al. Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival-a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 févr 2008;26(4):633-8.
124. Anderson PM, Meyers P, Kleinerman E, Venkatakrishnan K, Hughes DP, Herzog C, et al. Mifamurtide in Metastatic and Recurrent Osteosarcoma: A Patient Access Study with Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Safety Assessments. *Pediatr Blood Cancer*. févr 2014;61(2):238-44.
125. Complexities in Interpretation of Osteosarcoma Clinical Trial Results | *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. [cité 17 mai 2021]. Disponible sur: https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2008.17.3484?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed&
126. Tumors and Tumorlike Lesions of Bone - Pathology, Radiology, and Treatment | Fritz Schajowicz | Springer [Internet]. [cité 11 janv 2021]. Disponible sur: <https://www.springer.com/gp/book/9783642499562>
127. « Skip » metastases in osteosarcoma - PubMed [Internet]. [cité 11 janv 2021]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1060507/>
128. Scalas G, Parmeggiani A, Martella C, Tuzzato G, Bianchi G, Facchini G, et al. Magnetic resonance imaging of soft tissue sarcoma: features related to prognosis. *Eur J Orthop Surg Traumatol Orthop Traumatol*. 29 mai 2021;
129. Crombé A, Marcellin P-J, Buy X, Stoeckle E, Brouste V, Italiano A, et al. Soft-Tissue Sarcomas: Assessment of MRI Features Correlating with Histologic Grade and Patient Outcome. *Radiology*. juin 2019;291(3):710-21.
130. Zhao F, Ahlawat S, Farahani SJ, Weber KL, Montgomery EA, Carrino JA, et al. Can MR Imaging Be Used to Predict Tumor Grade in Soft-Tissue Sarcoma? *Radiology*. 1 juill 2014;272(1):192-201.
131. Lee JH, Yoon YC, Seo SW, Choi Y-L, Kim HS. Soft tissue sarcoma: DWI and DCE-MRI parameters correlate with Ki-67 labeling index. *Eur Radiol*. 1 févr 2020;30(2):914-24.
132. Malinauskaite I, Hofmeister J, Burgermeister S, Neroladaki A, Hamard M, Montet X, et al. Radiomics and Machine Learning Differentiate Soft-Tissue Lipoma and Liposarcoma Better than Musculoskeletal Radiologists. *Sarcoma*. 2020;2020:7163453.
133. Saleh MM, Abdelrahman TM, Madney Y, Mohamed G, Shokry AM, Moustafa AF. Multiparametric MRI with diffusion-weighted imaging in predicting response to chemotherapy in cases of osteosarcoma and Ewing's sarcoma. *Br J Radiol*. 1 nov 2020;93(1115):20200257.
134. Yuan W, Yu Q, Wang Z, Huang J, Wang J, Long L. Efficacy of Diffusion-Weighted Imaging in Neoadjuvant Chemotherapy for Osteosarcoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Acad Radiol*. 29 déc 2020;S1076-6332(20)30649-8.

135. Schmeel FC. Variability in quantitative diffusion-weighted MR imaging (DWI) across different scanners and imaging sites: is there a potential consensus that can help reducing the limits of expected bias? *Eur Radiol.* 1 mai 2019;29(5):2243-5.
136. Polverari G, Ceci F, Passera R, Crane J, Du L, Li G, et al. [18F]FDG PET/CT for evaluating early response to neoadjuvant chemotherapy in pediatric patients with sarcoma: a prospective single-center trial. *EJNMMI Res.* 15 oct 2020;10(1):122.
137. Dufau J, Bouhamama A, Leporq B, Malaureille L, Beuf O, Gouin F, et al. Prédiction de la réponse à la chimiothérapie des ostéosarcomes à partir des données radiomiques issues des IRM diagnostiques. *Bull Cancer (Paris).* 1 oct 2019;106.
138. PRIME PubMed | MRI-based radiomics signature for pretreatment prediction of pathological response to neoadjuvant chemotherapy in osteosarcoma: a multicenter study [Internet]. [cité 21 août 2021]. Disponible sur: <https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/33825032/>
139. Machine learning-based CT radiomics features for the prediction of pulmonary metastasis in osteosarcoma - PubMed [Internet]. [cité 4 sept 2021]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/34111978/>
140. Daldrup-Link HE, Golovko D, Ruffell B, Denardo DG, Castaneda R, Ansari C, et al. MRI of tumor-associated macrophages with clinically applicable iron oxide nanoparticles. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 sept 2011;17(17):5695-704.
141. Serkova NJ. Nanoparticle-Based Magnetic Resonance Imaging on Tumor-Associated Macrophages and Inflammation. *Front Immunol.* 2017;8:590.
142. The yin and yang of imaging tumor associated macrophages with PET and MRI [Internet]. [cité 21 août 2021]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6831464/>
143. Mohanty S, Yerneni K, Theruvath JL, Graef CM, Nejadnik H, Lenkov O, et al. Nanoparticle enhanced MRI can monitor macrophage response to CD47 mAb immunotherapy in osteosarcoma. *Cell Death Dis.* 15 2019;10(2):36.
144. Aghighi M, Theruvath AJ, Pareek A, Pisani LL, Alford R, Muehe AM, et al. Magnetic Resonance Imaging of Tumor Associated Macrophages: Clinical Translation. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 sept 2018;24(17):4110-8.
145. Gomez-Brouchet A, Gilhodes J, Acker NV, Brion R, Bouvier C, Assemat P, et al. Characterization of Macrophages and Osteoclasts in the Osteosarcoma Tumor Microenvironment at Diagnosis: New Perspective for Osteosarcoma Treatment? *Cancers.* 23 janv 2021;13(3):423.
146. Mbundi L, Meikle ST, Busquets R, Dowell NG, Cercignani M, Santin M. Gadolinium Tagged Osteoprotegerin-Mimicking Peptide: A Novel Magnetic Resonance Imaging Bio-specific Contrast Agent for the Inhibition of Osteoclastogenesis and Osteoclast Activity. *Nanomater Basel Switz.* 2 juin 2018;8(6):E399.
147. Xiao Y, Palomero J, Grabowska J, Wang L, de Rink I, van Helvert L, et al. Macrophages and osteoclasts stem from a bipotent progenitor downstream of a macrophage/osteoclast/dendritic cell progenitor. *Blood Adv.* 13 oct 2017;1(23):1993-2006.

RESUME EN ANGLAIS :

Osteosarcoma is the most common bone sarcoma in adolescents and young adults. However, the survival of metastatic patients and poor responders has not improved over the past decades. These tumors are characterized by a high degree of heterogeneity, especially at the molecular level, which does not allow the use of targeted therapy. New therapeutic avenues are interested in the microenvironment of these tumors which seems to play a major role in the growth and metastatic dissemination. The objective of this work was to correlate the spatial distribution of the immune microenvironment populations, by multiplex immunohistochemical study, with CT and MRI imaging. Thus, by combining clinical, histological and imaging characteristics, we hoped to optimize patient stratification for better therapeutic management. Unfortunately, there was no correlation between the biopsy and its imaging, concluding that the tumor heterogeneity on the biopsy was not representative. We also studied the spatial distribution of cells in the microenvironment, in relation to good and poor response territories, on a few surgical specimens after treatment in order to define a signature of resistance to treatment. Our preliminary results showed that CD68⁺ osteoclasts were associated with poor response territories and their role in treatment resistance. This work has also allowed us to create a collection with the biopsy/operational part pair that will be used for future projects.

ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION SPATIALE DU MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE DANS LES OSTEOSARCOMES ET CORRELATIONS AUX DONNEES DE L'IMAGERIE

RESUME EN FRANÇAIS :

L'ostéosarcome est le sarcome osseux le plus fréquent chez les adolescents et les jeunes adultes. Cependant, la survie des patients métastatiques et des mauvais répondeurs ne s'est pas améliorée au cours des dernières décennies. Ces tumeurs se caractérisent par une très grande hétérogénéité, notamment au niveau moléculaire, ne permettant pas l'utilisation de thérapie ciblée. De nouvelles pistes thérapeutiques s'intéressent au microenvironnement de ces tumeurs qui semble jouer un rôle prépondérant dans la croissance et la dissémination métastatique. L'objectif de ce travail a été de corréler la distribution spatiale des populations du microenvironnement immunitaire, par étude immunohistochimique multiplexe, avec l'imagerie TDM et IRM. Ainsi, en combinant les caractéristiques cliniques, histologiques et d'imagerie, nous espérons optimiser la stratification des patients pour une meilleure prise en charge thérapeutique. Malheureusement, il n'existait pas de corrélation entre la biopsie et son imagerie, nous faisant conclure à la non-représentativité de l'hétérogénéité tumorale sur la biopsie. Nous avons également étudié la distribution spatiale des cellules du microenvironnement, par rapport aux territoires de bonne et de mauvaise réponse, sur quelques pièces opératoires après traitement par chimiothérapie dans le but de définir une signature de résistance au traitement. Nos résultats préliminaires ont montré que les ostéoclastes CD68+ étaient associés aux territoires de mauvaises réponses renforçant leur rôle dans la résistance aux traitements. Ce travail nous a également permis de créer une collection avec le couple biopsie/pièces opératoires qui serviront pour des projets futurs.

TITRE EN ANGLAIS : Study of the spatial distribution of the immune microenvironment in osteosarcomas and correlations to imaging data

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée clinique – Anatomie et cytologie pathologiques

MOTS-CLÉS : Ostéosarcomes, microenvironnement tumoral, analyse radiologique, immunohistochimie fluorescente multiplexe, analyses d'images, macrophages, ostéoclastes

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

Directeur de thèse : Pr Anne GOMEZ-BROUCHET