

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
FACULTÉ DE MÉDECINE, MAÏEUTIQUE ET SCIENCES DE LA SANTÉ

ANNÉE : 2023

N° : 170

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Diplôme d'État
Mention : D.E.S. de PÉDIATRIE

PAR

Camille PACAUD

Née le 6 février 1995 à Viriat (01)

**Signature protéique macrophagique et hypoxique en lien avec la survie dans
les sarcomes d'Ewing**

Président de thèse : Professeur C. PAILLARD
Membres du jury de thèse: Dr C. NAZON, Dr J. GANTZER, Dr A. FATTORI
Directeur de thèse : Professeur N. ENTZ-WERLE

NOM de l'enseignant	CF*	Services enseignés au sein de l'Unité d'Enseignement	Domaines de l'Ordre National des Universités
Mme SOISSON Françoise		- Fisiologie végétale - végétal (anatomie) et semiologie / Vieilles et jeunes	40.02 - Optique - Radiobiologie végétale et physiologie
Mme COUËR Huguette		- Fisiologie végétale - anatomie et vieilles / -optique des végétaux	40.02 - Radiobiologie végétale, physiologie et semiologie / anatomie et vieilles
Mme COLLET Dominique		- Fisiologie végétale (anatomie, histologie, semiologie, anatomie végétale, biochimie) - Services de Radiobiologie et Optique des végétaux	40.02 - Radiobiologie
Mme TALAGAND-REZOU, Corine		- Fisiologie végétale - végétal (anatomie) et semiologie / Vieilles et jeunes	40.02 - Optique - Radiobiologie végétale (vieilles et jeunes)
Mme SARRA		- Fisiologie végétale et anatomie - services de physiologie et semiologie / Vieilles et jeunes	40.02 - Physiologie végétale et vieilles
Mme YVES-ROBERT		- Fisiologie végétale et anatomie - services de physiologie et semiologie / Vieilles et jeunes	40.02 - Anatomie et vieilles
Mme MARI		- Fisiologie végétale - services de physiologie et semiologie / Vieilles et jeunes	40.02 - Anatomie et vieilles des végétaux et anatomie et vieilles (vieilles et jeunes)
Mme MARI		- Fisiologie végétale - Laboratoire d'écologie et de biologie - Vieilles et jeunes	40.02 - Radiobiologie, anatomie et vieilles / Anatomie et biologie
Mme MARI-ROSE Aurélie		- Fisiologie végétale - Laboratoire de Physiologie / Vieilles et jeunes	40.02 - Radiobiologie végétale, physiologie et anatomie / Anatomie et biologie
Mme MARI-ROSE		- Fisiologie végétale - services de physiologie et semiologie / Vieilles et jeunes	40.02 - Radiobiologie et physiologie (vieilles et jeunes)
Mme ZALIZNICA Irina (cf. voir ci-dessus)		- Fisiologie végétale et anatomie - services de physiologie et semiologie / Vieilles et jeunes	40.02 - Radiobiologie
Mme MARI		- Fisiologie végétale - services de physiologie et semiologie / Vieilles et jeunes	40.02 - Physiologie et vieilles et jeunes

02 – PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS (monopartenaire)

Mme MARI-ROSE	Laboratoire d'écologie et de biologie - Vieilles et jeunes (UEV)	40 - Radiobiologie - Anatomie et vieilles et jeunes / Vieilles et jeunes
---------------	--	--

03 – MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS (monopartenaire)

Mme GAMBRIÈRE	UEV 095 7257 - Optique et Vieilles et jeunes	04 - Radiobiologie
Mme BULLIENNE Anne-Françoise	UEV 095 7257 - Optique et Vieilles et jeunes	03 - Anatomie et vieilles
Mme MARI-ROSE	Laboratoire d'écologie et de biologie - Vieilles et jeunes (UEV)	40 - Radiobiologie - Anatomie et vieilles et jeunes / Vieilles et jeunes
Mme MARI-ROSE	Laboratoire d'écologie et de biologie - Vieilles et jeunes	40 - Anatomie et vieilles
Mme MARI-ROSE	Laboratoire d'écologie et de biologie - Vieilles et jeunes (UEV)	40 - Radiobiologie - Anatomie et vieilles et jeunes / Vieilles et jeunes
Mme MARI-ROSE	Laboratoire d'écologie et de biologie - Vieilles et jeunes (UEV)	40 - Radiobiologie - Anatomie et vieilles et jeunes / Vieilles et jeunes
Mme MARI-ROSE	Laboratoire d'écologie et de biologie - Vieilles et jeunes (UEV)	40 - Radiobiologie - Anatomie et vieilles et jeunes / Vieilles et jeunes
Mme MARI-ROSE	Laboratoire d'écologie et de biologie - Vieilles et jeunes (UEV)	40 - Radiobiologie - Anatomie et vieilles et jeunes / Vieilles et jeunes

F1 - PROFESSEURS EMÉRITES

- de droit et d'ingénierie biomédicale (jusqu'en 2011)
 - GILBERT Pierre (Généraliste et Biologie moléculaire)
 - MULLER André (Généraliste et Biologie moléculaire)
- pour médecine (jusqu'en 2004) et jusque en 2007
 - GILBERT Jean Pierre (Généraliste de Pathologie)
 - GIBOT Marie-Cécile (Médecine infectieuse et parasitaire)
 - GARNIER Jean-Pierre (Généraliste)
 - GUYON Daniel (Physiologie expérimentale)
 - GUYOT Jean-François (Chirurgie orthopédique et de la main)
 - HENRIOT-ROBERT Jocelyne (Généraliste et Biologie moléculaire)
 - MULLER André (Généraliste et Biologie moléculaire)
 - MULLER Gérard (Généraliste)
- pour médecine (de septembre 2004 ou de août 2007)
 - GUYON Daniel (Physiologie expérimentale)
 - GUYON Marie-Cécile (Médecine infectieuse et parasitaire)
 - HENRIOT-ROBERT Jocelyne (Généraliste et Biologie moléculaire)
 - MULLER Jean-François (Généraliste)
- pour médecine (de septembre 2004 ou de août 2007)
 - MULLER André (Généraliste et Biologie moléculaire)

F2 - PROFESSEUR des UNIVERSITÉS ASSOCIÉ (mi-temps)

de droit et d'ingénierie biomédicale

de 1 à 11

de 1 à 11

F3 - PROFESSEURS CONVENTIONNÉS DE L'UNIVERSITÉ

de 1 à 11

SERMENT D'HIPPOCRATE



" En présence des Maîtres de cette École, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque. "

REMERCIEMENTS

Au Professeur Entz-Werle :

Je vous remercie tout d'abord pour l'inspiration que vous m'avez apportée en suggérant le sujet de ma thèse. Votre expertise a été précieuse pour guider mes recherches et m'orienter vers ce domaine qui m'intéresse profondément.

Je suis reconnaissante de votre contribution à mon parcours académique. Merci aussi pour votre générosité et votre engagement envers l'avancement de la recherche.

Au Professeur Paillard :

Merci de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Je tiens également à vous exprimer ma plus sincère gratitude pour votre engagement au cours de mon parcours en médecine. Votre expertise et votre passion pour l'oncohématologie pédiatrique sont une source d'inspiration pour moi.

Au Dr Nazon:

Je te remercie d'avoir accepté immédiatement de faire partie de mon jury ainsi que pour ta gentillesse et ta disponibilité. Je me réjouis de la perspective de collaborer ensemble bientôt.

Plus globalement merci à l'équipe d'oncohématologie Strasbourgeoise qui va m'accueillir pour mon poste de Docteur Junior. Je suis contente d'intégrer à nouveau votre équipe.

Au Dr Gantzer:

Je vous remercie beaucoup pour l'intérêt que vous portez à mon sujet. Votre expertise dans le domaine des sarcomes est reconnue et respectée et c'est une opportunité précieuse pour moi de pouvoir bénéficier de votre évaluation.

Au Dr Fattori:

Je te remercie pour ton enthousiasme immédiat sur ce projet, tes conseils et ton aide dans la réalisation de celui-ci. Je tiens également à te remercier chaleureusement pour les nombreux envois de "gros fichiers" anapath... Même avec ton emploi du temps chargé, tu as su te rendre disponible pour ce travail, et cela signifie beaucoup pour moi.

A mes chers parents, pour leur amour inconditionnel, leur soutien et leur bienveillance, je suis toujours impressionnée par votre dévotion sans limite pour nous.

À ma grande sœur Alice, mon inspiration depuis la naissance, la douceur en personne, continues d'éclairer ma vie de ta lumineuse gentillesse.

A ma famille qui m'accompagne. Une pensée spéciale pour mon incroyable tonton Jacques. A Maléna, ma "petite" cousine, je suis fière de ce que tu deviens. A Catherine et Marc, pour tous ces bons moments auprès de vous, merci pour votre précieuse compagnie et votre générosité. Aussi à ceux qui m'observent d'en haut: ma tante Christine, mon grand père Robert, ma grand mère Simone, pépé Jean et mémé Régine.

A mon extraordinaire Jujumoutte, notre amitié depuis 15ans et à toutes les aventures qui nous restent à partager.

Aux potes de Bourg-en-Bresse, dont ceux qui m'ont "suivie" à Strasbourg, Alex et Jules, c'est que du bonheur de vous avoir. A ma Deena, pour ton amitié en or sertie de diamants.

À la fine équipe des copines de Lyon Est: Clara, Noémie (mon Béno), Mathilde, Nelsie, Clem, Mégane, vous êtes essentielles à mon bien être, je vous aime tout simplement.

A Julien, pour ton soutien depuis la PACES, j'ai hâte de te retrouver à Strasbourg.

A notre famille Strasbourgeoise: Yoanna, Hadri, Tanguy, Nathan (et Julio ... même si il dort par terre dans la 5ème chambre).

Aux "vieux" internes de la Pédiatrie Strasbourgeoise côtoyés en stage: Anaïs (gros love sur toi), Lucas, Sarah, Maxence et Dr Joyeux. Avant tout aux Razmokets: Manon, Guillaume, Pierre, Pauline, Armelle, Alice, Rafifou et Alicia .. . Aux plus jeunes aussi: Inès, Elise.

Ciccio, mon coloc Lyonnais, mon alter-ego Tarantais, le roi du café trop serré, come hai detto "per aspera ad astra". Ti voglio bene.

A la team Mulhouse 1er semestre: Jéjé, ML, Léo, Hubert, Elo, Féli, Aitau... À la salle tonus, aux pizzas du Bacio et autres soirées. Et aussi à tous les copains de Strasbourg: Laure, Mathilde, Aline, Olivier, Franck, Ana, Gab...

A ma kiné Laurène: merci d'avoir rendu cet épisode des croisés plus supportable. Fière d'être dans la team Mac Lauren.

Aux équipes de Pédiatrie, médicales et paramédicales de Strasbourg, pour vos précieux enseignements.

A Antoine, notre équipe surpasse mes attentes jour après jour. Malgré tes allergies, tu fais preuve de beaucoup de force envers la vie et je t'admire pour ça, mon vrai BG de la Yaute. Merci de me tirer toujours plus vers le haut (sauf quand il s'agit d'humour).

A tous les enfants hospitalisés dont j'ai croisé la route, votre résilience et votre joie sont au cœur de ma motivation.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	23
MATERIEL ET METHODE.....	33
1. Constitution de la population d'étude.....	33
2. Protocole d'analyse des tumeurs en imagerie : mesure de la tumeur et la nécrose intra-tumorale.....	34
2.1. Mesure du volume global	34
2.2. Mesure de la nécrose.....	34
2.3. Analyse de la part de nécrose.....	35
3. Préparation des échantillons, technique d'immunohistochimie et principes de l'analyse automatisée des marquages.....	35
3.1. Préparation des lames.....	36
3.2. Immunomarquage avec les anticorps spécifiques.....	37
3.3. Lecture des lames.....	38
3.3.1. Logiciel.....	38
3.3.2. Protocole de détection.....	38
4. Analyses statistiques.....	39
RÉSULTATS.....	42
1. Diagramme de flux pour définir notre population d'étude.....	42
2. Données descriptives.....	43
2.1. Caractéristiques cliniques.....	43
2.2. Données de survie.....	46
3. Caractéristiques de l'imagerie.....	47
3.1. Données descriptives.....	49
3.2. Test statistiques de corrélation entre volume tumoral, volume de nécrose, pourcentage de nécrose et le décès/la rechute.....	49
3.2.1. Corrélation avec le décès.....	49
3.2.2. Corrélation avec la rechute.....	50
3.3. Corrélation entre données radiologiques et autres données cliniques.....	51
3.3.1. Corrélation entre données radiologiques.....	51
3.3.2. Corrélation avec le profil métastatique.....	52
3.3.3. Corrélation avec la localisation du primitif.....	52
3.3.4. Corrélation avec l'âge.....	53
3.3.5. Corrélation avec le taux de LDH.....	53
4. A propos des résultats immunohistochimiques.....	54
4.1. Caractéristiques des marqueurs d'hypoxie (pS6RP, p-mTOR, HIF1A et HIF2) en immunohistochimie.....	54
4.1.1. Exemples de coloration sur le logiciel QuPath.....	55
4.1.2. Données globales d'immunohistochimie des marqueurs de l'hypoxie.....	56
4.1.3. Test statistique de corrélation entre les marqueurs d'hypoxie et le décès/la rechute.....	58
4.1.4. Relation entre les données radiologiques, données cliniques, biologiques et immunohistochimiques.....	64

5. Biomarqueurs hypoxiques et macrophagiques étudiés par immunohistochimie et leurs corrélations cliniques.....	69
5.1. Caractéristiques de l’infiltration macrophagique avec les marquages immunohistochimiques.....	69
5.2. Corrélations statistiques entre les pourcentages de Macrophages M1 et M2 et les événements cliniques : décès, récurrence.....	73
5.2.1. Corrélation avec le décès.....	73
5.2.2. Corrélation avec la rechute.....	73
5.3. Corrélation avec les autres données cliniques, radiologiques, d’hypoxie et macrophagiques.....	74
5.3.1. Corrélation avec données radiologiques.....	74
5.3.2. Corrélation avec le profil métastatique.....	75
5.3.3. Corrélation avec la localisation du primitif.....	76
5.3.4. Corrélation avec l’âge.....	76
5.3.5. Corrélation avec le taux de LDH.....	77
5.3.6. Corrélation avec les marqueurs d’hypoxie.....	77
DISCUSSION.....	79
CONCLUSION.....	90
ANNEXES.....	91
BIBLIOGRAPHIE.....	93
DÉCLARATION SUR L’HONNEUR.....	96
RÉSUMÉ.....	97

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Radiographie du bassin de face, IRM (T1 injecté, séquence coronale) et TEP/TDM au FDG (18-Fluorodeoxyglucose) d'un patient de 15 ans porteur d'un sarcome d'Ewing.....	25
Figure 2 : Produits des gènes FET et ETS à l'origine des protéines de fusion EWS	26
Figure 3 : Description des voies de signalisation contrôlant la réponse à l'oxygène dans le tissu osseux.	29
Figure 4 : Voie de signalisation de l'hypoxie: description schématique des biomarqueurs impliqués dans la normoxie (A) et l'hypoxie (B) et leur interaction.....	30
Figure 5 : Illustration du principe de l'immunohistochimie (IHC).....	36
Figure 6 : Diagramme de flux de la population étudiée.....	42
Figure 7 : Données démographiques et cliniques de la population.....	45
Figure 8 : Courbe de survie globale (OS).....	46
Figure 9 : Courbe de survie sans événement (EFS).....	47
Figure 10 : Exemple de coupe axiale d'une tumeur en T1 injecté (A) d'une lésion atypique de sarcome d'Ewing avec primitif du tissu mou abdominal avec contour du volume global (B) et du volume de nécrose (C).....	48
Figure 11 : Boxplots représentant la répartition dans la cohorte du volume tumoral et du volume de nécrose sur l'IRM au diagnostic.....	49
Figure 12 : Tableau résumant la comparaison entre les groupes vivants/décédés pour le volume tumoral, le volume de nécrose et le pourcentage de nécrose sur l'IRM pré-thérapeutique et son impact statistique.	50
Figure 13 : Tableau de comparaison des groupes en fonction de la rechute pour chaque variable radiologique.....	50
Figure 14 : Corrélation entre les marqueurs radiologiques.	51
Figure 15 : Comparaison des groupes en fonction du statut métastatique au diagnostic pour chaque variable radiologique.....	52
Figure 16 : Tableau de comparaison pour les marqueurs radiologiques en fonction de la localisation du primitif au diagnostic.....	52
Figure 17 : Tableau de comparaison des groupes en fonction du statut pédiatrique ou adulte au diagnostic pour chaque variable radiologique.	53
Figure 18 : Corrélation entre les marqueurs radiologiques et le taux de LDH au diagnostic...	53
Figure 19 : Exemples de résultats en coloration immunohistochimique avec les différents marqueurs de l'hypoxie.....	55
Figure 20 : Boxplots et tableau représentant la répartition dans la cohorte du pourcentage de cellules tumorales positives pour chaque marqueur : p-mTOR, pS6RP, HIF1A et HIF2.....	56
Figure 21 : Tableau de comparaison entre les groupes vivants/décédés pour les marqueurs d'hypoxie (Nombre total de patients dans chaque groupe =N).....	58
Figure 22 : Boxplot représentant le pourcentage de cellules positives pour p-mTOR chez les patients vivants à gauche (N=28) et chez les patients décédés à droite (N=8).	59

Figure 23 : Courbe ROC pour évaluer la capacité à prédire le décès en fonction du pourcentage de cellules p-mTOR positives tumorales.....	60
Figure 24 : Survie globale (OS) des patients en fonction de l'expression positive (supérieure au seuil ROC calculé) ou non de p-mTOR.....	61
Figure 25 : Tableau de comparaison entre les groupes rechute et absence de rechute pour les marqueurs d'hypoxie	63
Figure 26 : Tableau de corrélation entre les marqueurs radiologiques et hypoxiques au diagnostic.....	64
Figure 27 : Tableau de comparaison pour les marqueurs d'hypoxie en fonction de la présence ou non de métastases au diagnostic.....	65
Figure 28 : Tableau de comparaison pour les marqueurs d'hypoxie en fonction de la localisation du primitif au diagnostic.....	66
Figure 29 : Tableau de comparaison des groupes en fonction du statut pédiatrique ou adulte au diagnostic pour chaque marqueur d'hypoxie.....	67
Figure 30 : Tableau de corrélation entre les marqueurs hypoxiques et taux de LDH (U/L) au diagnostic.....	67
Figure 31 : Exemples de coloration immunohistochimique avec CD68 et CD163.....	70
Figure 32 : Boxplots et tableau représentant la répartition dans la cohorte de patients du pourcentage de cellules positives dans le stroma et dans le tissu tumoral pour les marqueurs CD68 et CD163.....	72
Figure 33 : Analyse comparative des marqueurs macrophagiques entre les groupes cliniques de patients vivants à long terme et les patients décédés.	73
Figure 34 : Analyse comparative des marqueurs macrophagiques entre les groupes cliniques de patients ayant présenté une rechute et ceux indemnes de rechute.....	74
Figure 35 : Tableau de corrélation entre les marqueurs radiologiques et macrophagiques au diagnostic.....	74
Figure 36 : Comparaison des groupes en fonction du statut métastatique au diagnostic pour chaque variable macrophagique.....	75
Figure 37 : Tableau de comparaison pour les marqueurs macrophagiques en fonction de la localisation du primitif au diagnostic.....	76
Figure 38 : Tableau de comparaison des groupes en fonction du statut pédiatrique ou adulte au diagnostic pour chaque marqueur d'hypoxie.	76
Figure 39 : Tableau de corrélation entre les marqueurs macrophagiques et le taux de LDH (U/L) au diagnostic.....	77
Figure 40 : Tableau de corrélation entre les marqueurs hypoxiques et macrophagiques au diagnostic.....	77
Figure 41 : Modèle de modulation du microenvironnement tumoral par les TAMs dans les EWS.....	87

TABLE DES ABREVIATIONS

CD163	Cluster of Differentiation 163
CD68	Cluster of Differentiation 68
CRB	Centre de Ressources Biologiques
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DRO	dérivés réactifs de l'oxygène
DS	Déviation Standard
EFS	<i>Event Free Survival - Survie sans événement</i>
ETS	<i>E-twenty-six</i>
EWS	Sarcome d'Ewing
EWSR1	<i>Ewing's Sarcoma breakpoint Region 1</i>
HIF1A	Facteur induisible par l'hypoxie-1 alpha (ou HIF-1 α)
HIF2	Facteur induisible par l'hypoxie-2
HR	Hazard Ratio
HUS	Hôpitaux universitaires de Strasbourg
IC	Interval de confiance
IFN γ	interféron gamma
IL-12	interleukine 12
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LAL B	<i>Leucémie aiguë lymphoïde B</i>
LDH	Lactate DeHydrogenase
OS	<i>Overall Survival - Survie globale</i>
p-mTOR	phospho- mammalian target of rapamycin (mTOR)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pS6RP	phospho- Ribosomal protein S6
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
ROC	<i>Receiver operator characteristics</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
VDC-IE	Vincristine, doxorubicin, cyclophosphamide, ifosfamide et etoposide
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VIDE	Vincristine, Ifosfamide, Doxorubicin, Etoposide

INTRODUCTION

Le sarcome d'Ewing (EWS) est une tumeur agressive des os et tissus mous, décrite pour la première fois en 1921 par James Ewing (1). Cette tumeur neuroectodermique est de point de départ périosté et sa cellule d'origine est dérivée de la crête neurale. Elle peut survenir à tout âge, son diagnostic prédomine cependant chez les enfants, les adolescents et les jeunes adultes. C'est la deuxième cause la plus fréquente de tumeur osseuse maligne, avec un pic d'incidence à 15 ans. Il existe une prédominance masculine (SR=1,6). (2). L'incidence est de 1 cas pour 1,5 millions d'habitants (2), avec en France 80 à 100 nouveaux cas par an (3).

Dans 80% des cas, la tumeur primitive est osseuse. Le squelette axial (45% des cas) est la principale localisation, notamment le pelvis et les côtes. Au niveau des os longs (30% des cas), elle est de localisation diaphysaire. Dans 20% des cas, on trouve des localisations extra-osseuses notamment paravertébrales ou thoraciques, mais qui peuvent concerner toutes les parties du corps. Les localisations extra osseuses sont plus fréquentes chez les adultes (2).

Au diagnostic, entre 20 et 35% des patients présentent des métastases, ce qui est le principal élément prédictif d'un pronostic défavorable. Les métastases du sarcome d'Ewing se localisent généralement dans les poumons, les os et la moelle, mais elles peuvent également toucher d'autres organes tels que les ganglions, le foie et le cerveau. La sévérité de la présence de métastases varie en fonction de leur type, les métastases ostéo-médullaires étant notamment associées à un pronostic plus sombre. (2,3)

Le mode de révélation, non spécifique, se manifeste souvent par de la douleur ou la découverte fortuite d'une masse souvent douloureuse, chaude parfois érythémateuse. Dans 10 à 15% des cas, le diagnostic est secondaire à une fracture pathologique. Dans les formes les plus avancées, on retrouve une altération de l'état général des patients.

Les examens sanguins sont peu évocateurs du diagnostic de EWS. Cependant, le dosage de Lactate DeHydrogenase (LDH) est un marqueur d'agressivité tumorale et un taux élevé au diagnostic est facteur de mauvais pronostic (4).

Un complément par imagerie est nécessaire, souvent évocateur de la malignité de la lésion (5). La radiographie standard, souvent réalisée lors des premières explorations, met en évidence une lésion lytique avec des images d'appositions périostées en "bulbe d'oignon" ou un triangle de Codman évocatrices d'agressivité. L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est un examen de choix pour le système musculo-squelettique et sert au bilan initial et d'évolutivité en cours de traitement (6). Cette imagerie permet également de détecter des skip métastases localisées au niveau du même os ou dans les os sus- et ou sous-jacents.



Figure 1 : Radiographie du bassin de face, IRM (T1 injecté, séquence coronale) et TEP/TDM au FDG (18-Fluorodeoxyglucose) d'un patient de 15 ans porteur d'un sarcome d'Ewing.

On observe une lésion lytique expansive affectant l'hémi-sacrum gauche, avec discrète réaction périostée périphérique, envahissement du muscle piriforme gauche et du canal sacré. Un hypermétabolisme intense (SUVmax = 13,4) est présent caractérisant la lésion tumorale mixte de l'hémi-sacrum gauche. Il s'y associe plusieurs lésions osseuses lytiques également intensément hypermétaboliques, d'allure secondaire.

Le diagnostic est confirmé exclusivement sur l'évaluation histologique et moléculaire d'une biopsie de la tumeur primitive ou d'une lésion métastatique accessible. L'analyse microscopique retrouve une tumeur à petites cellules rondes et bleues avec un ratio noyau/cytoplasme élevé, exprimant en immunohistochimie le CD99 de façon non spécifique (6).

La confirmation du diagnostic moléculaire vise à mettre en évidence un transcrite de fusion dit initiateur, impliquant d'une part le gène codant pour Ewing's Sarcoma breakpoint Region 1 (EWSR1) localisé sur le chromosome 11 et d'autre part des gènes appartenant à la famille E-twenty-six (ETS). Ce transcrite différencie cette famille de EWS des formes dites « Ewing-like » (7). Dans 85 à 90% des cas, il s'agit de la translocation t(11;22) (q24;q12), conduisant à la fusion d'EWSR1 et du facteur de transcription Friend Leukemia virus Integration 1 (FLI1) (8).

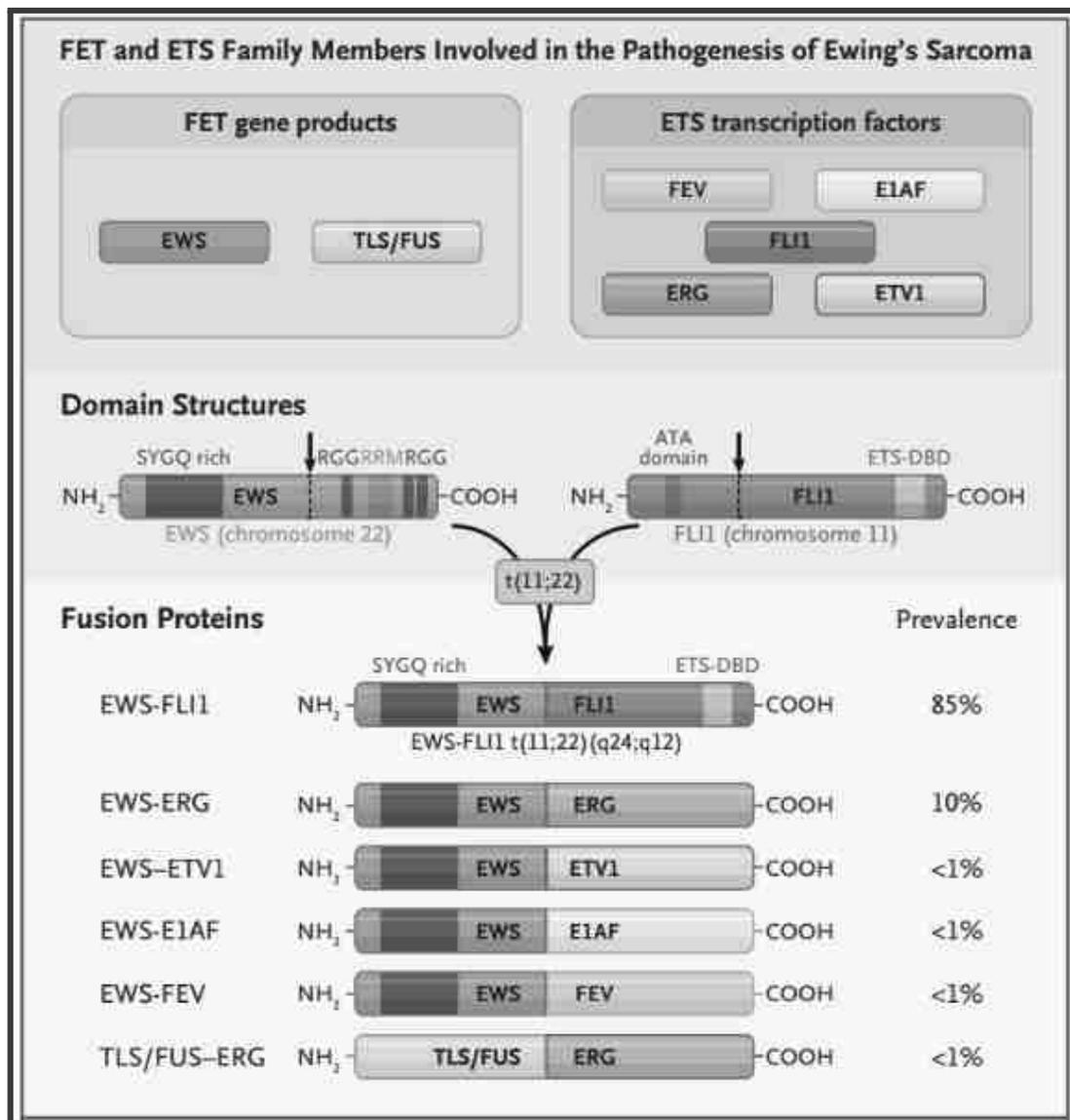


Figure 2 : Produits des gènes FET et ETS à l'origine des protéines de fusion EWS - (extrait de Riggi et al., New England Journal of Medicine, 2021)

La protéine de fusion EWSR1-FLI1 peut être facilement recherchée par hybridation in situ ou par Polymerase Chain Reaction (PCR) sur le tissu d'intérêt. Le deuxième transcrite de fusion le plus fréquent est EWS-ERG t(21;22)(q21;q12) à hauteur de 10% des cas.

La stratégie thérapeutique actuelle en Europe est multimodale et s'appuie d'abord sur une chimiothérapie néo-adjuvante. Elle est suivie d'une chirurgie et/ou d'une radiothérapie puis d'une chimiothérapie adjuvante (9) adaptée à la réponse tumorale à la chimiothérapie « pré-opératoire ». Cette réponse tumorale est basée sur un grading histologique réalisé sur la pièce d'exérèse après la chimiothérapie néoadjuvante. Le patient est dit bon répondeur en cas de présence de moins de 10% de cellules tumorales résiduelles (5). Une réponse positive à la chimiothérapie associée à un pronostic favorable dans les EWS. (10)

La survie globale à 5 ans est de 80% pour les patients ayant une tumeur localisée et avec une bonne réponse tumorale au traitement. Cette survie globale chute à 25% à 5 ans en cas de présence de métastases notamment ostéo-médullaires. Malgré une amélioration considérable du pronostic dans les formes localisées avec un traitement multimodal agressif, les rechutes sont fréquentes et principalement métastatiques. Elles peuvent concerner jusqu'à 30 à 40% des patients ayant initialement une maladie localisée et 60 à 80% des patients qui ont une maladie d'emblée métastatique au diagnostic.

Le contrôle de la maladie lorsqu'elle est récurrente ou disséminée est médiocre avec les thérapeutiques actuelles. C'est pourquoi il est essentiel de découvrir de nouvelles méthodes pour identifier dès le départ les patients à pronostic défavorable, afin d'adapter leur traitement et pourquoi pas d'explorer de nouvelles options thérapeutiques.

Dans les sarcomes comme les EWS, le développement du cancer est un processus complexe impliquant la régulation du métabolisme, de la survie et de la multiplication des cellules. D'autre part, l'interaction entre les cellules cancéreuses en croissance et le microenvironnement tumoral joue un rôle essentiel dans leur comportement.

Dans ce cadre, il est essentiel de prendre en compte la vascularisation péri-tumorale, qui varie en raison de la néoangiogenèse. Les régions moins bien approvisionnées en sang peuvent connaître une nécrose spontanée, surtout autour des zones les plus prolifératives de la tumeur. Celles-ci se caractérisent par une hypoxie (faible taux d'oxygène entre 5 et 1%), qui peut contribuer à l'évolution nécrotique. Il y aurait une association entre une nécrose tumorale étendue avec la présence de métastases et une survie réduite chez les patients atteints de sarcomes d'Ewing.(11)

L'hypoxie joue également un rôle dans la survie des cellules tumorales confrontées à cet environnement peu propice à leur multiplication (12,13). Ainsi, en réponse à ce microenvironnement hostile, les cellules s'adaptent en sécrétant des facteurs importants dans la progression du cancer, tels que les facteurs inductibles par l'hypoxie (HIF) (14).

Ceci est d'autant plus important que dans les EWS, puisque l'hypoxie et les HIF contribueraient à la régulation dynamique de l' oncogène EWSR1:FLI1 (1). De plus, il est largement accepté que HIF1A joue un rôle essentiel dans la progression métastatique et l'invasion tumorale des EWS (15-17).

Cependant, il est important de noter que le rôle de HIF1A dans les cellules cancéreuses va au-delà de sa médiation de la réponse à l'hypoxie. En effet, même en présence d'une concentration normale en oxygène dans l'organe étudié (ce qui est d'environ 8 à 9%

d'oxygène dans l'os, appelée physioxie), HIF1A peut être activé par des facteurs de croissance ou des oncogènes par le biais de cascades de signalisation telles que la voie PI3K/AKT sérine/thréonine kinase 1 et Ras/Raf/mTor (MAPK), ainsi que par l'inactivation de suppresseurs de tumeurs tels que PTEN ou TP53 (Figure 3). Cette activation de HIF par des voies alternatives, est appelée pseudohypoxie.

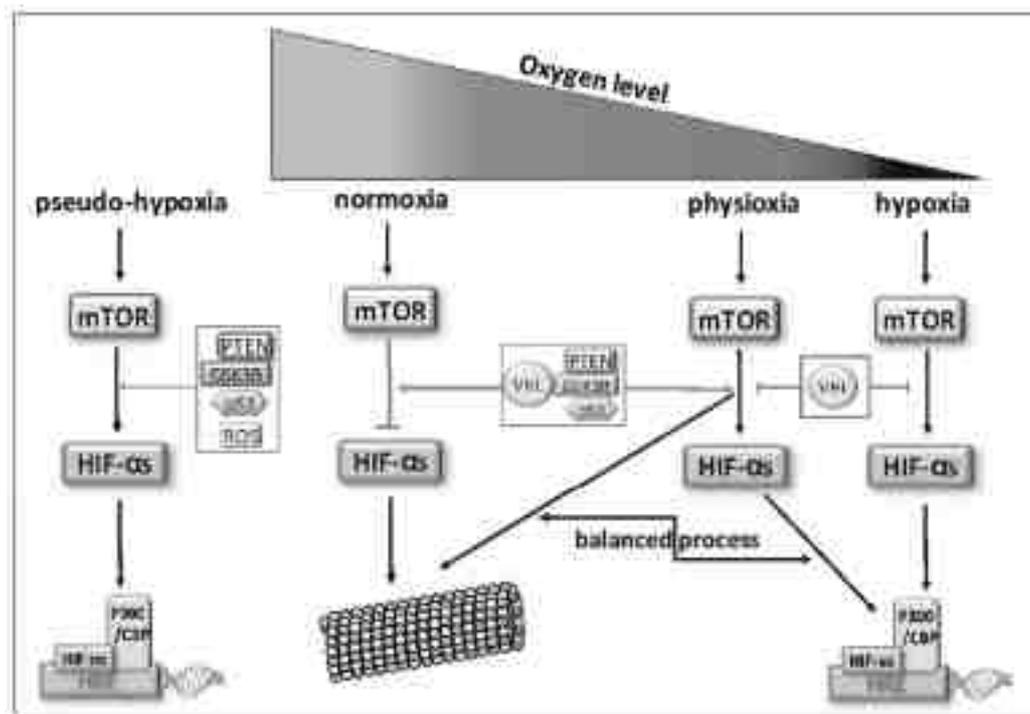


Figure 3 : Description des voies de signalisation contrôlant la réponse à l'oxygène dans le tissu osseux. (extrait de Pierrelvein et al., Cells, 2020)

Le facteur HIF2 moins étudié dans les EWS est dans la plupart des cancers considéré comme le facteur de l'hypoxie chronique, alors que HIF1A semble impliqué plus fréquemment dans les processus aigus d'hypoxie (20). Les deux ont pour répercussion à l'échelon cellulaire une adaptation de la cellule notamment sur le plan métabolique.

D'autres facteurs appartiennent à cette cascade de l'hypoxie en amont des HIF impliqués dans la voie Ras/Raf/mTor (MAPK) tels que pS6RP et p-mTOR. (Figure 4)

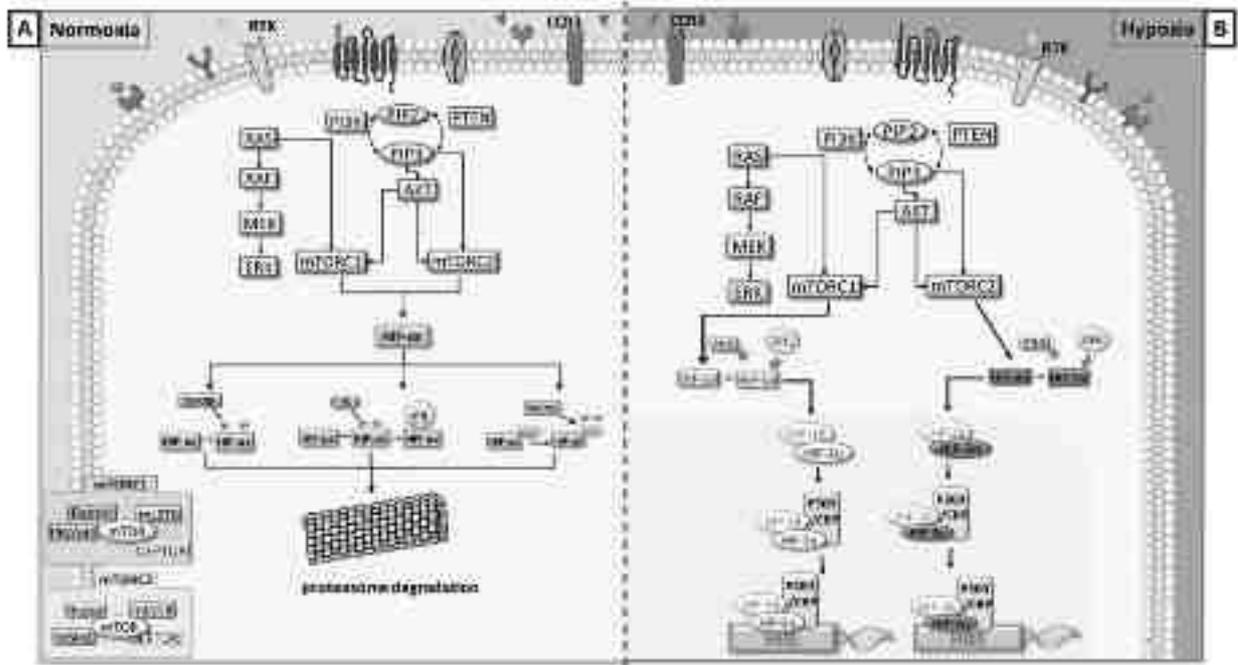


Figure 4 : Voie de signalisation de l'hypoxie: description schématique des biomarqueurs impliqués dans la normoxie (A) et l'hypoxie (B) et leur interaction. (extrait de Pierrelvelcin et al., Cells, 2020)

Il est primordial de noter que dans les zones hypoxiques, d'importants bouleversements se produisent dans le microenvironnement immunitaire, plus spécifiquement au sein des macrophages. Ces derniers, également appelés "Macrophages Associés à la Tumeur" ou TAM, sont impliqués dans la progression tumorale (21). Dans les EWS, qui sont qualifiés de "tumeurs froides" en raison de leur faible ou de leur absence d'infiltration par les lymphocytes T, les TAM constituent la majeure partie des cellules immunitaires péri-tumorales (20). Les TAM sont des cellules polyvalentes qui peuvent moduler leur état d'activation et leur phénotype en réponse aux signaux dictés par l'environnement.

Il existe schématiquement deux voies d'activation différentes dans les TAM, bien que cette dichotomie soit controversée. Ces deux voies correspondent à deux phénotypes macrophagiques distincts. Le phénotype M1, voie de différenciation dite classique, aurait un effet pro-inflammatoire et donc principalement anti-tumoral. Les macrophages M1 sont activés par l'interféron gamma (IFN γ) mais aussi les résidus microbiens et sécrètent l'interleukine 12 (IL-12), le Tumor Necrosis Factor (TNF), qui aboutissent à la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) stimulant l'immunité Th1 et la suppression des cellules tumorales. Le phénotype M2, voie de différenciation dite alternative, présenterait un effet pro-tumoral et semblerait activée dans les zones tumorales hypoxiques (21). En effet, les cellules tumorales hypoxiques produisent des cytokines comme l'oncostatine, le TGF- β ou l'IL-6 qui provoqueraient cette activation alternative (M2) des macrophages pour favoriser la progression tumorale et supprimer la réponse immunitaire anti-tumorale en bloquant les lymphocytes T et les cellules NK (Natural Killer) (21). Dans l'étude de Stahl et al., il apparaît que les macrophages M2 présents dans le microenvironnement des EWS seraient corrélés à un mauvais pronostic (22). Cette même étude met également en évidence qu'une forte expression de HIF1A était corrélée à une importante proportion de macrophages M2 (22). A notre connaissance, il n'existe que peu de données phénotypiques en immunohistochimie étudiant le lien entre hypoxie et le microenvironnement tumoral macrophagique dans les EWS.

Nous proposons dans notre étude une analyse rétrospective de l'expression de marqueurs associés à l'hypoxie, tels que HIF1A, HIF2, phospho-s6-RP (pS6RP), et phospho-mTor (p-mTOR) , ainsi que des marqueurs du microenvironnement macrophagique, notamment CD68 (considéré comme un marqueur pan-macrophagique parfois associé à la voie de différenciation M1) et CD163 (orienté vers la voie de différenciation M2). Pour cela, nous avons utilisé des échantillons biologiques provenant de patients atteints de sarcomes d'Ewing diagnostiqués et pris en charge entre 2003 et 2022 dans notre établissement, les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS). En parallèle, nous avons évalué et quantifié la nécrose tumorale à partir des IRM diagnostiques de chaque patient. En combinant ces données immunohistochimiques et radiologiques, notre objectif est de les corrélérer avec les données cliniques, notamment en ce qui concerne la survie globale et la survie sans récurrence.

MATERIEL ET METHODE

1. Constitution de la population d'étude

Les patients diagnostiqués et référés dans notre établissement aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS) de 2003 à 2022 pour une prise en charge oncologique et chirurgicale d'un sarcome d'Ewing (EWS) ont été inclus dans l'étude de façon rétrospective. La liste des patients éligibles est issue de la base de données d'anatomopathologie. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique local de notre établissement et une déclaration à la Commission Informatique et Liberté (CNIL) sous le numéro 1970 390 v0 a été effectuée. Les patients ont été informés de l'étude lors d'une consultation de suivi et par une fiche descriptive de l'étude. L'ensemble des patients inclus ont consenti à l'utilisation de leurs échantillons tumoraux diagnostiques conservés au Centre de Ressources Biologiques des HUS. L'ensemble de l'étude a été conduite selon les principes éthiques de la déclaration d'Helsinki.

Les données cliniques, thérapeutiques, radiologiques et moléculaires diagnostiques ont été recueillies afin d'effectuer des corrélations statistiques avec les résultats des marqueurs immunohistochimiques HIF1A, HIF2, pS6RP, p-mTOR, CD68 et CD163.

Le diagnostic histologique de EWS a été confirmé par l'aspect microscopique associé à la présence d'un marquage au CD99 positif et le diagnostic moléculaire par la présence d'un transcrite de fusion EWS-ETS positif (2). L'absence de transcrits de fusion du spectre des EWS a été un critère d'exclusion du patient, ainsi que l'absence de matériel exploitable en immunohistochimie.

2. Protocole d'analyse des tumeurs en imagerie : mesure de la tumeur et la nécrose intra-tumorale

Pour définir le volume tumoral et la nécrose au diagnostic, nous avons utilisé les IRM pré-thérapeuthiques (IRM 1.5 Tesla). Ces imageries sont toutes conservées au serveur d'imagerie médicale P.A.C.S. (Picture Archiving and Communication System) des HUS. Le logiciel utilisé était Centricity Universal Viewer software® (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

Les mesures de volume étaient préférentiellement réalisées sur les séquences T1 gadolinium axiales, avec un intervalle de 3mm entre chaque coupe. En cas d'absence de séquence axiale, l'évaluation était réalisée en coupe sagittale.

L'appréciation des volumes a été réalisée par un unique médecin opérateur supervisé par un Radiologue spécialisé référent (Dr T. Willaume).

2.1. Mesure du volume global

Afin de définir le volume tumoral total, les marges tumorales étaient délimitées manuellement à l'aide d'un pinceau informatique sur chaque coupe concernée. Les sections de tumeur contourées étaient ensuite analysées à l'aide d'un outil de reconstruction 3D pour obtenir un volume (en cm³). (Figure 10.B.)

2.2. Mesure de la nécrose

La définition de la nécrose en séquence T1 injectée correspond aux zones non rehaussées de la tumeur, qui apparaissent en hyposignal par rapport au muscle.

Le travail a consisté, comme pour le volume global, à délimiter cette portion non-réhaussée sur chaque coupe. Ensuite, l'utilisation de la reconstruction 3D permettait d'obtenir le volume de nécrose (Figure 10.C.).

2.3. Analyse de la part de nécrose

Nous avons calculé le pourcentage de nécrose en divisant le volume de nécrose par le volume tumoral total.

3. Préparation des échantillons, technique d'immunohistochimie et principes de l'analyse automatisée des marquages

Pour rappel, l'immunohistochimie fonctionne sur le principe de la réaction antigène-anticorps et donne un aperçu de la teneur en protéine et de sa distribution spatiale.

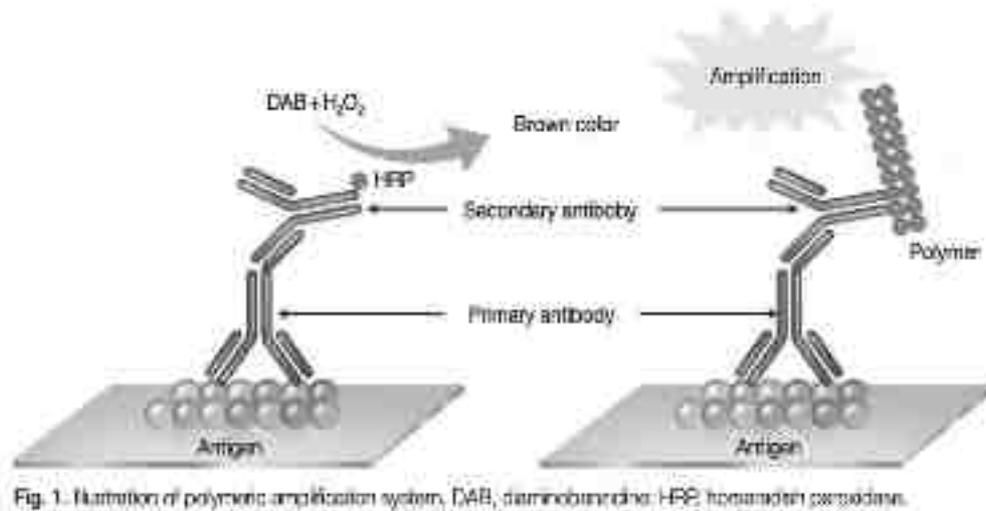


Figure 5 : Illustration du principe de l'immunohistochimie (IHC) (Extrait de Kim SW et al., Journal of Pathology and Translational Medicine, 2016)

3.1. Préparation des lames

Pour chaque patient, nous avons préparé 6 lames, soit une lame par anticorps. Deux types de lames blanches étaient utilisées:

- Pour les prélèvements osseux, nous avons utilisé les lames TOMO (référence TOM-1190, MATSUNAMI), pour les qualités d'adhérences de la coupe.
- Pour les prélèvements non osseux, nous avons utilisé les lames HISTOCORE PERMASLIDE PLUS (référence 3800455CL, marque LEICA).

Nous avons récupéré les blocs de paraffine des patients inclus et provenant de la tumorotheque du Centre de Ressources Biologiques des HUS (Hôpitaux Universitaires de Strasbourg). Afin de réaliser des coupes fines, les blocs ont été mis à refroidir sur une plaque froide afin de favoriser leur coupe. Puis, une coupe à 4µm était réalisée à l'aide du microtome (Microm HM340E). Ces coupes ont été ensuite déposées dans un bain marie contenant de l'eau à 45°C sans albumine afin de déplier la coupe. Enfin, elles étaient

récupérées à l'aide d'une lame en verre, égouttées puis finalement stockées au réfrigérateur (-4°C).

3.2. Immunomarquage avec les anticorps spécifiques

Cette technique est effectuée en utilisant un système automatisé BenchMark Ultra Ventana XT (Ventana Medical system, Inc., Tucson, AZ, USA). Une première étape de déparaffinage des lames par chauffage à 100°C est suivie par un temps de séchage afin de restaurer les antigènes cibles. Après un prétraitement utilisant le tampon ULTRA Cell Conditioning 1 (05424569001, Roche), l'activité peroxydase est bloquée par le tampon CM inhibitor (Ventana). L'incubation avec chaque anticorps primaire est suivie d'une amplification de signal avec le tampon ultraWash (Ventana) et d'une révélation colorée avec le kit de détection ultraView Universal DAB (3,3'-Diaminobenzidine) (Ventana). Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : CD68 (clone KP1, M0814, Dako, dilution: 1/1000^e), CD163 (clone 10D6, MS-1103-S, Neomarkers, dilution: 1/200^e), HIF-1 α (ab8366, Abcam, dilution: 1/1000^e), p-mTOR (clone 49F9, Cell Signaling, dilution: 1/100^e), pS6RP (clone54D2, Cell Signaling, dilution: 1/100^e) et HIF-2 α (MA1-16519, Invitrogen, dilution 1/150^e)

Après coloration, les échantillons sont rincés à l'eau puis déshydratés en utilisant deux rinçages avec de l'éthanol suivis de deux rinçages avec du xylène. Ensuite, les lames sont insérées dans les colleuses (Microm CTM6, Thermo ScientificTM), qui fixent le marquage sur la lame. Le protocole résumé d'immunomarquage pour chaque anticorps est indiqué en Annexe 1.

3.3. Lecture des lames

3.3.1. Logiciel

Pour quantifier la coloration des cellules en immunohistochimie, nous avons utilisé une méthode semi-quantitative, via le logiciel QuPath (v0.4.3) (23). QuPath est un logiciel de pathologie numérique qui permet d'analyser des lames entières en haute résolution en réduisant le biais d'évaluation inter- et intra-observateur.

3.3.2. Protocole de détection

La commande de détection de cellule de QuPath a été appliquée pour identifier les cellules positives pour la coloration cellulaire, cytoplasmique et/ou nucléaire. Avant l'analyse de la lame, il faut étalonner cette commande de détection afin qu'elle discrimine au mieux les cellules positives. Il faut choisir l'étendue de chaque cellule, l'intensité de coloration pour le DAB, le rapport surface noyau/cellule.

La surface de détection choisie était le noyau pour HIF1A et HIF2 (Figure 4), le cytoplasme pour pS6RP, p-mTOR et pour CD68 et CD163 .

Nous avons décidé d'un même protocole de détection, reproductible pour chaque anticorps. Pour chaque lame, nous avons évalué de façon aléatoire trois zones de 1mm² chacune. Lorsqu'il y avait moins de 3 mm² analysable, nous avons évalué toute la lame. Pour les prélèvements fragmentés, nous avons réalisé plus de zones afin d'atteindre 3 mm².

Pour les anticorps ciblant l'expression de CD68 et CD163, le marquage a été évalué sur chaque lame à la fois dans les lobules tumoraux et les zones stromales adjacentes à ces

plages en raison d'une plus fréquente présence des macrophages dans les zones stromales selon certaines publications dans les EWS. (24, 25)

Pour les autres anticorps, nous avons analysé le marquage de façon aléatoire dans les zones tumorales.

Pour chacune des évaluations nous avons renseigné la surface de tissu analysée en mm², le nombre de cellules totales dans ces surfaces (tumorales ou stromales selon la zone), le nombre de cellules positives dans la surface.

Toutes les lames ont été numérisées (format Tag Image File Format).

Pour les lames inexploitable après numérisation, le pourcentage de cellules marquées a été évalué visuellement au microscope par deux opérateurs différents.

Comme contrôle positif du test, nous avons utilisé des coupes provenant de ganglions, de tumeur cérébrale et de cancer pulmonaire avec une expression positive connue respectivement du CD68, CD163, pS6RP/p-mTOR et HIF1A/HIF2. En tant que contrôle négatif, nous avons utilisé les mêmes échantillons que pour les positifs mais incubés sans anticorps primaire.

4. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée sur MacOS avec EasyMedStat (version 3.29).

Les **données descriptives** sont exprimées en moyenne et écart type (DS, déviation standard) si l'histogramme révèle une distribution d'allure symétrique, dans le cas contraire, la médiane ainsi que les premier et troisième quartile (Q1, Q3) sont indiqués.

La **corrélacion entre les variables quantitatives** a été évaluée par le coefficient de Spearman. La normalité de la distribution des données a été évaluée avec les tests de Shapiro-Wilk. La corrélation a été jugée très forte de 1 à 0,9, forte de 0,9 à 0,7, modérée de 0,7 à 0,5, faible de 0,5 à 0,3 et très faible de 0,3 à 0. Le risque alpha a été fixé à 0,05.

L'indépendance entre les variables qualitatives comme le décès / la rechute / la présence de métastases et les variables quantitatives ont été testées à l'aide d'un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (distribution non normale des données évaluée à l'aide du test de Shapiro-Wilk). Le risque alpha a été fixé à 5 %.

Les **données d'analyses pronostiques** sont basées sur des analyses ROC (Receiver operator characteristics). Celles-ci ont été réalisées pour chaque marqueur en cas de validation d'une corrélation significative avec l'événement décès ou rechute. L'indice de Youden a été utilisé afin de trouver un seuil pour chaque marqueur. L'événement pris en compte était la rechute avec décès dans le devenir ou progression. Nous avons utilisé la **méthode de Kaplan-Meier** pour estimer les probabilités de survie et leurs intervalles de confiance ponctuels à 95 %. Les valeurs P inférieures à 0,05 ont été considérées statistiquement significatives.

La **survie globale (OS)** a été définie comme le temps écoulé entre le diagnostic biopsique et le décès quelle qu'en soit la cause ou la date des dernières nouvelles (donnée censurée). La **survie sans événement (EFS)** a été définie comme le temps écoulé entre le diagnostic biopsique et la rechute, la progression ou le décès.

Notre objectif principal était d'étudier dans une cohorte rétrospective de sarcomes d'Ewing (EWS) l'impact de marqueurs immunohistochimiques macrophagiques (CD68 et CD163) et hypoxiques (pS6, HIF1A, HIF2, p-mTOR) sur la survie (globale et sans récurrence) ainsi que sur des paramètres cliniques, biologiques et radiologiques. Cette étude est basée sur l'hypothèse de travail qui est l'existence probable de signatures immunohistochimiques hypoxiques et/ou macrophagiques impactant sur le pronostic et l'évolution des patients suivis pour EWS.

RÉSULTATS

1. Diagramme de flux pour définir notre population d'étude

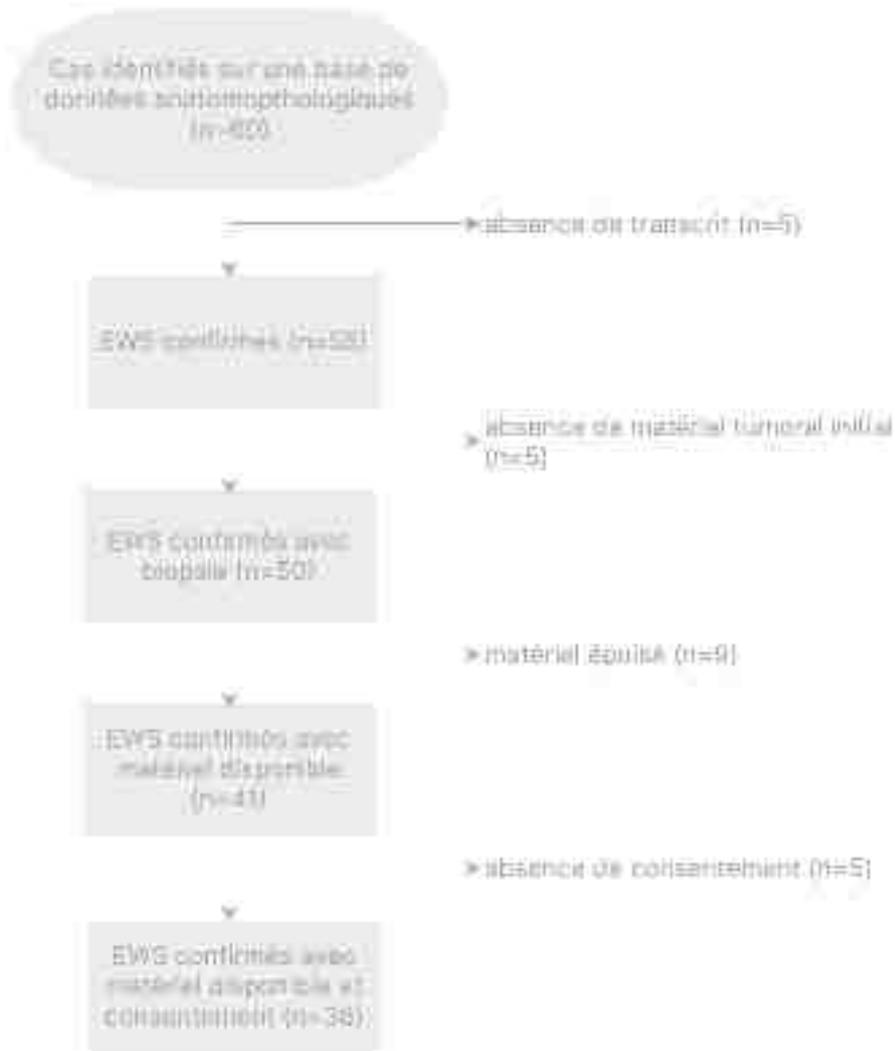


Figure 6 : Diagramme de flux de la population étudiée

2. Données descriptives

2.1. Caractéristiques cliniques

La population était composée de 36 patients. L'âge médian était de 16 ans (Q1-Q3: [13;21]).

L'échantillon comportait 23 hommes (63,9%). Le sex ratio (H:F) est donc de 1,76. Un patient présentait un antécédent de Leucémie Aiguë Lymphoïde B avec remaniement MLL, ayant nécessité une allogreffe.

Le transcrit EWS-FLI1 était majoritaire, exprimé chez 28 patients (66,7%), les autres patients présentaient un transcrit EWS-ERG.

La localisation principale était osseuse chez 30 patients (83,3%), dont 20 patients qui présentaient une tumeur du squelette axial (66,7%). Six patients présentaient un primitif extra-osseux. Quinze patients étaient métastatiques au diagnostic (41,7%), avec principalement des métastases pulmonaires (huit cas). Les autres patients avaient des métastases ostéo-médullaires ou ganglionnaires.

Le taux médian de LDH (norme <246 UI/L) au diagnostic était élevé à 335UI/L [238;484]. Par comparaison chez les patients décédés, le taux de LDH médian s'élevait à 382UI/L contre 320U/L chez les patients vivants (p=0,297).

Trente-quatre des patients (94%) ont bénéficié d'une chimiothérapie néo adjuvante par VDC/IE ou VIDE selon les protocoles (EURO EWING 99, EURO EWING 12 ou COMBINAIR3).

Trente et un patients (86%) ont eu une prise en charge chirurgicale de la tumeur primitive.

L'exérèse était R0 pour 22 patients (73,3%). Parmi les patients opérés, 19 patients (sur 24 pour lesquels l'anatomopathologie était disponible) étaient bons répondeurs histologiques après chimiothérapie préopératoire (79%). Le pourcentage médian de cellules nécrosées était de 99 % [95;100].

Ces patients ont reçu par la suite majoritairement une radiochimiothérapie (16/31). Six patients ont reçu une intensification thérapeutique avec support en cellules souches hématopoïétiques (CSH) avec ensuite une radiothérapie (3/6).

Sur les cinq patients n'ayant pas pu bénéficier d'une exérèse chirurgicale, un patient a été opéré après radiochimiothérapie avec une exérèse R0.

Trois patients dans la cohorte ont eu une chimiothérapie d'entretien.

Quinze patients ont rechuté avec un délai médian de 1,8 ans [1,4;2,9]. Parmi ces quinze patients en rechute, 14 étaient métastatiques au moment du diagnostic.

Huit patients (22,2%) sont décédés. Le délai médian avant le décès était de 2,9 ans [2,1; 3,7]. L'âge médian au décès était de 22,4 ans [19,1;25,3]. Six patients décédés avaient des localisations secondaires ostéomédullaires.

Concernant le reste de la population, au terme de l'étude: vingt-cinq patients étaient en rémission (69,5%) et 3 avaient progressé (8,3%).

Les données démographiques et cliniques sont résumées dans la Figure 7.

		Commentaires (ND= données manquantes)
Caractéristiques épidémiologiques		
Age au diagnostic (med + EQ)	16 [13 - 21]	
Sexe masculin (N+ %)	23/36 (63,9 %)	
Antécédent onco-hématologique (N+ %)	1/36 (2,8 %)	
Caractéristiques de la maladie		
LDH au diagnostic (med + EQ)	335 [298 - 484]	ND = 11
Transcrit (N+ %)		
EWS-ERG	6/36 (22,2 %)	
EWS-FLI1	28/36 (77,8 %)	
Primitif osseux (N+ %)	30/36 (83,3%)	E primitifs extra-osseux (cervical, tête-périthoracal, nuque, torse)
bassin osseux	9/30	
os longs	10/30	
vertébral	4/30	
costal	6/30	
scapula	1/30	
Primitif extra-osseux (N+ %)	6/36 (16,7%)	
cuisse	2/6	
abdominal	1/6	
cervical	1/6	
sein	1/6	
pigeon	1/6	
N° au diagnostic (N+ %)	15/36 (41,7 %)	
Caractéristiques thérapeutiques		
Chirurgie initiale (N+ %)	31/36 (86,1 %)	
dont exérèse R0	22/30 (73,3 %)	ND = 1
Ilots répondeurs histologiques (RUVOS)	19/34 (55,9 %)	ND = 2
% cellules nécrosées (med + EQ)	99 % [95 - 100]	
Chimiothérapie néoadjuvante (N+ %)	34/36 (94,4%)	
CT adjuvante seule (N+ %)	8/36 (22,2%)	dont 1 patient non opéré initialement
RT adjuvante seule (N+ %)	8/36 (22,2 %)	dont 1 patient non opéré initialement
Radiochimiothérapie adjuvante (N+ %)	19/36 (52,8 %)	dont 3 patients non opérés initialement
CT ND (N+ %)	6/36 (16,7%)	
Traitement d'entretien par CT métronomique	3/36 (8,3%)	patients inclus dans COMBAR3
Evolution		
Rechute (N+ %)	15/36 (41,7 %)	
Délai rechute (med + EQ)	1,8 [1,4 - 2,8]	
Nombre de décès (N+ %)	8/36 (22,2 %)	
Délai avant décès (med + EQ)	2,9 [2,1 - 3,7]	
Age au décès (med + EQ)	22,6 [19,1 - 25,3]	
Temps de suivi (med+EQ)	5,6 [3,1 - 10,4]	
Rémission (N+ %)	25/36 (69,4 %)	

Les données sont exprimées par une médiane associée à l'écart interquartile (med + EQ) ou par le nombre de patient associé au pourcentage (N + %)

Figure 7 : Données démographiques et cliniques de la population

2.2. Données de survie

Les courbes de Kaplan Meier des figures 7 et 8 représentent respectivement la survie globale de la cohorte (OS) et la survie sans événement (EFS).

La durée médiane du suivi était de 8 ans (1-17). À 5 ans, l'OS était de 78,2 % (IC à 95 % : 59,5-89,0). A 10 ans, l'OS était de 73,6 % (IC à 95 % : 53,5-86,1).

L'EFS à 2 ans était de 77,3 % (IC 95 % : 59,6-88,0) et à 5 ans était de 57,8 % (IC 95 % : 39,1-72,7).

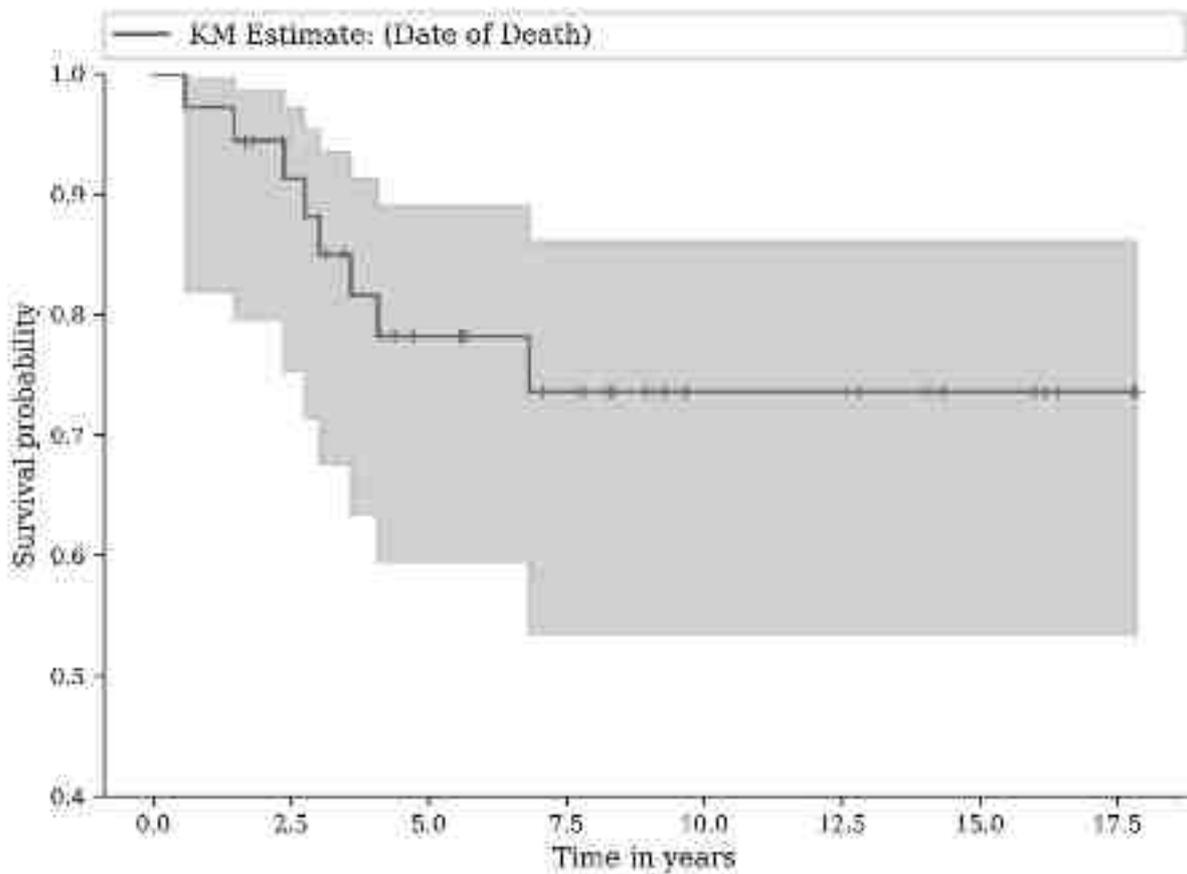


Figure 8 : Courbe de survie globale (OS)

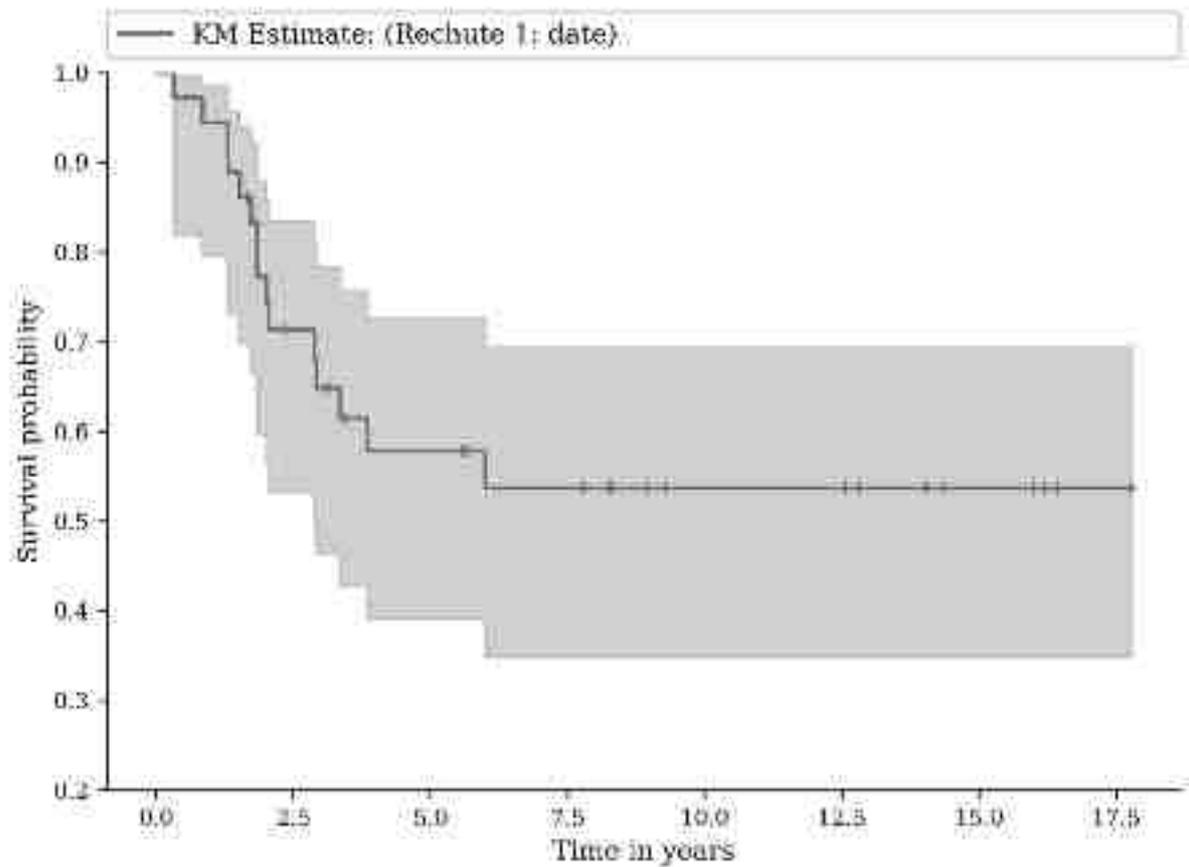


Figure 9 : Courbe de survie sans événement (EFS)

3. Caractéristiques de l'imagerie

Vingt-quatre patients disposaient d'une imagerie par IRM utilisables pour l'étude au diagnostic. Les autres patients n'avaient pas eu d'IRM ou n'avaient pas les séquences de choix. Pour rappel, les volumes tumoraux et de nécrose ont été calculés à l'aide d'un logiciel d'imagerie sur les IRM pré-thérapeutiques de chaque patient (Figure 10).

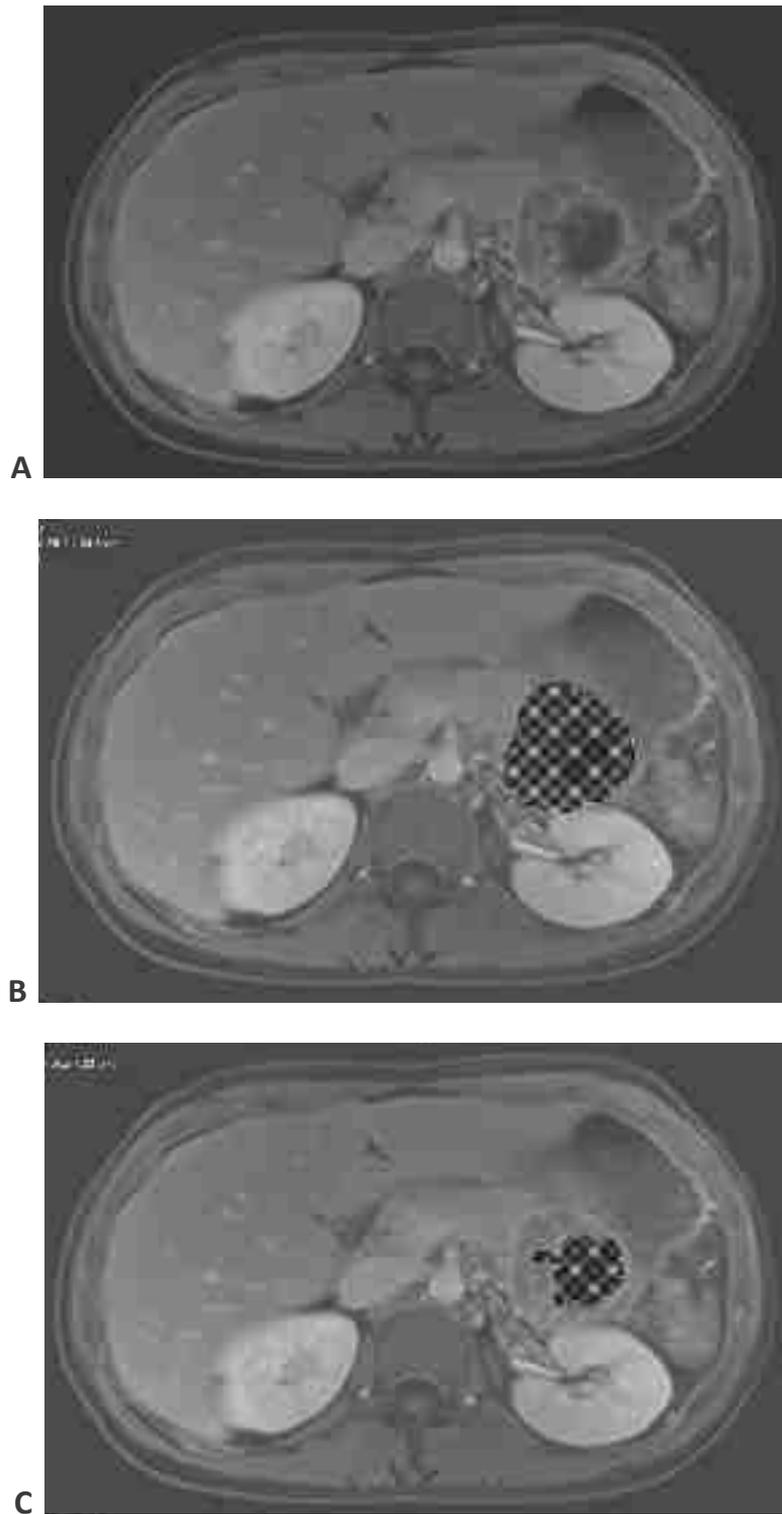


Figure 10 : Exemple de coupe axiale d'une tumeur en T1 injecté (A) d'une lésion atypique de sarcome d'Ewing avec primitif du tissu mou abdominal avec contour du volume global (B) et du volume de nécrose (C)

3.1. Données descriptives

Le volume tumoral médian au diagnostic était de 85cm³ [26,3; 119,3]. Trois patients avaient un volume tumoral supérieur à 200cm³. Le volume de nécrose médian était de 7,5cm³ [1,8; 39]. Le pourcentage médian de nécrose était de 20% [9%;26%].

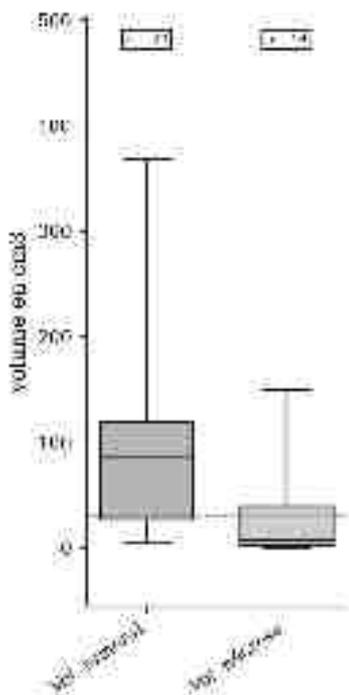


Figure 11 : Boxplots représentant la répartition dans la cohorte du volume tumoral et du volume de nécrose sur l'IRM au diagnostic.

3.2. Test statistiques de corrélation entre volume tumoral, volume de nécrose, pourcentage de nécrose et le décès/la rechute.

3.2.1. Corrélation avec le décès

Il n'y avait pas de différence significative entre les patients vivants et décédés en termes de volume tumoral, de volume de nécrose et de pourcentage de nécrose au diagnostic.

La Figure 12 représente l'ensemble de ces données et leur potentielle significativité.

Variable étudiées sur IRM au diagnostic	Patients vivants (N total)	Patients décédés (N total)	p-Value
Volume tumoral (cm ³)	85.0 (EIQ 144.0) N = 19	59.0 (EIQ 62.0) N = 5	0.522
Volume de nécrose (cm ³)	7.0 (EIQ 38.5) N = 19	22.0 (EIQ 19.0) N = 5	0.772
% Nécrose	0.2 (EIQ 0.16) N = 19	0.27 (EIQ 0.17) N = 5	0.135

Figure 12 : Tableau résumant la comparaison entre les groupes vivants/décédés pour le volume tumoral, le volume de nécrose et le pourcentage de nécrose sur l'IRM pré-thérapeutique et son impact statistique. Les données fournies sont la médiane, l'Écart Interquartile (EIQ) et le degré de significativité (p).

Le volume tumoral médian sur l'IRM était de 59cm³ chez les patients décédés et de 85 cm³ chez les patients vivants (p=0,522). Le volume de nécrose médian était de 22 cm³ chez les patients décédés et de 7cm³ chez les patients vivants (p=0,722). Le pourcentage de nécrose médian était de 27% chez les patients décédés et de 20% chez les patients vivants (p=0,135). Au total, ces données radiologiques ne montraient pas de différence significative en lien avec le décès.

3.2.2. Corrélation avec la rechute

Variable	Absence de rechute (N total)	Présence de rechute (N total)	p-Value
Volume tumoral (cm ³)	85.0 (EIQ 154.0) N = 13	59.0 (EIQ 76.0) N = 11	0.4
Volume de nécrose (cm ³)	7.0 (EIQ 40.0) N = 13	8.0 (EIQ 28.0) N = 11	0.931
% Nécrose	0.2 (EIQ 0.15) N = 13	0.2 (EIQ 0.17) N = 11	0.4

Figure 13 : Tableau de comparaison des groupes en fonction de la rechute pour chaque variable radiologique. Les données fournies sont la médiane, l'Écart Interquartile (EIQ) et le degré de significativité (p).

Les patients ayant rechuté n'avaient pas de différence significative de volume tumoral, de volume de nécrose et de pourcentage de nécrose au diagnostic.

3.3. Corrélation entre données radiologiques et autres données cliniques

3.3.1. Corrélation entre données radiologiques

Une forte corrélation positive a été identifiée dans les observations suivantes :

- Entre le volume tumoral et le volume de nécrose ($\rho = 0,8$; $r^2 = 0,628$; $p < 0,001$).
- Entre le volume de nécrose et le pourcentage de nécrose ($\rho = 0,8$; $r^2 = 0,588$; $p < 0,001$).

Il y avait une corrélation légèrement positive entre le pourcentage de nécrose et la taille initiale de la tumeur ($\rho = 0,42$; $r^2 = 0,138$; $p = 0,041$) ce qui indique que lorsque la taille initiale de la tumeur augmentait, le pourcentage de nécrose avait tendance à augmenter également, bien que cette relation ne soit pas très forte.

Variable		IRM DCN Vol. tumoral (cm3)	IRM DCN Vol. Nécrose (cm3)	IRM DCN % Nécrose
1. IRM DCN Vol. tumoral (cm3)	Spearman's rho	—		
	p-value	—		
2. IRM DCN Vol. Nécrose (cm3)	Spearman's rho	0.799	—	
	p-value	< .001	—	
3. IRM DCN % Nécrose	Spearman's rho	0.420	0.799	—
	p-value	0.041	< .001	—

Figure 14 : Corrélation entre les marqueurs radiologiques. Données fournies: coefficient de corrélation Rho= ρ de Spearman, degré de significativité (p).

3.3.2. Corrélation avec le profil métastatique

Il n'y avait pas de différence significative entre les patients métastatiques et localisés en termes de volume tumoral, de volume de nécrose et de pourcentage de nécrose au diagnostic. On note tout de même que les volumes tumoraux et de nécrose semblaient plus importants chez les patients métastatiques.

Variable	Absence de métastase N = 21	Présence de métastase(s) N = 15	p-Value
Volume tumoral (cm3)	44.0 (EIQ 77.5) N = 14	98.0 (EIQ 55.75) N = 10	0.101
Volume de nécrose (cm3)	6.5 (EIQ 35.5) N = 14	16.5 (EIQ 34.75) N = 10	0.747
% Nécrose	0.21 (EIQ 0,13) N = 14	0.165 (EIQ 0,18) N = 10	0.54

Figure 15 : Comparaison des groupes en fonction du statut métastatique au diagnostic pour chaque variable radiologique. Les données fournies sont la médiane, l'Écart Interquartile (EIQ) et le degré de significativité (p).

3.3.3. Corrélation avec la localisation du primitif

Variable	Primitif osseux (N total)	Primitif extra-osseux (N total)	p-Value
Volume tumoral (cm3)	80 (EIQ 72,8) N=20	241,5 (EIQ 173,8) N=4	0,151
Volume de nécrose (cm3)	6.5 (EIQ 26.25) N=20	84.0 (EIQ 106.25) N=4	0,13
% Nécrose	0,2 (EIQ 0,16) N=20	0,27 (EIQ 0,38) N=4	0,45

Figure 16 : Tableau de comparaison pour les marqueurs radiologiques en fonction de la localisation du primitif au diagnostic (Nombre total de patients dans chaque groupe =N). Expression en pourcentage de cellules positives avec médiane, EIQ et p.

On observe une augmentation du volume tumoral et de la nécrose chez les patients présentant un primitif extra-osseux, bien que ce lien ne soit pas statistiquement significatif.

3.3.4. Corrélation avec l'âge

Variable	Patient <18ans (N total)	Patient >18ans (N total)	p-Value
Volume tumoral (cm3)	85.0 (EIQ 71.0) N = 17	102.0 (EIQ 90.0) N = 7	0,634
Volume de nécrose (cm3)	6.0 (EIQ 23.0) N =17	37.0 (EIQ 33.0) N = 7	0,192
% Nécrose	0,17 (EIQ 0,14) N = 14	0,37 (EIQ 0,19) N = 10	0,056

Figure 17 : Tableau de comparaison des groupes en fonction du statut pédiatrique ou adulte au diagnostic pour chaque variable radiologique. Les données fournies sont la médiane, l'Écart Interquartile (EIQ) et le degré de significativité (p).

Le pourcentage de nécrose médian était de 37% chez les patients adultes et de 17% chez les enfants (p=0,056), ce qui signifie qu'il y avait une tendance non significative à un taux de nécrose plus élevé chez les adultes.

3.3.5. Corrélation avec le taux de LDH

Variable		IRM DGN Vol. tumoral (cm3)	IRM DGN Vol. Nécrose (cm3)	IRM DGN % Nécrose
1. IRM DGN Vol. tumoral (cm3)	Spearman's rho p-value	— —		
2. IRM DGN Vol. Nécrose (cm3)	Spearman's rho p-value	0.799 <.0001	— —	
3. IRM DGN % Nécrose	Spearman's rho p-value	0.4211 <.0041	0.299 <.001	— —
4. LDH au DGN (U/L)	Spearman's rho p-value	-0.311 0.214	-0.378 0.148	0.267 0.318

Figure 18 : Corrélation entre les marqueurs radiologiques et le taux de LDH au diagnostic. Données fournies: coefficient de corrélation Rho= ρ de Spearman, degré de significativité (p)

Une faible corrélation négative a été trouvée entre le taux de LDH (U/L) et le volume tumoral, le volume de nécrose ainsi que le pourcentage de nécrose. Cela suggère que lorsque l'une de ces variables radiologiques augmente, les LDH tendent à diminuer, mais cela reste non significatif.

4. A propos des résultats immunohistochimiques

L'analyse via QuPath s'est révélée réalisable pour la quasi-totalité des échantillons, démontrant ainsi une grande adaptabilité de cette méthode à notre ensemble de données.

4.1. Caractéristiques des marqueurs d'hypoxie (pS6RP, p-mTOR, HIF1A et HIF2) en immunohistochimie

Nous avons quantifié le pourcentage de cellules qui ont été marquées sur chaque lame (pour rappel, une lame par patient pour chaque anticorps) pour les anticorps appartenant à la cascade de l'hypoxie : p-mTOR, pS6RP, HIF1A, HIF2.

4.1.1. Exemples de coloration sur le logiciel QuPath

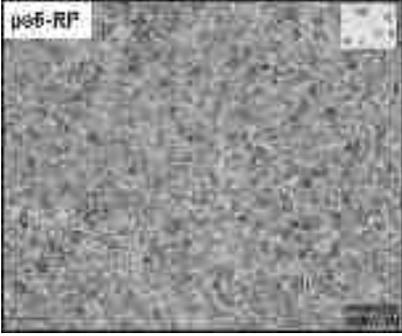
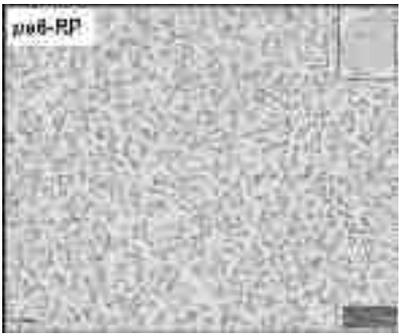
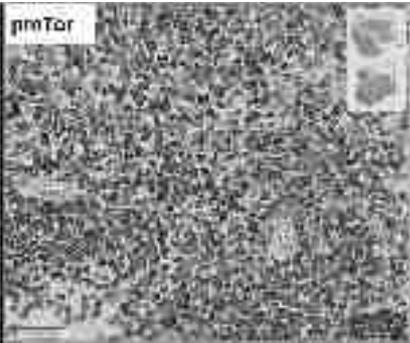
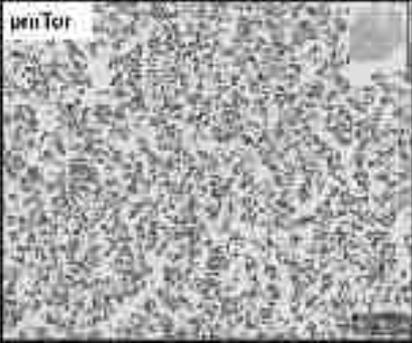
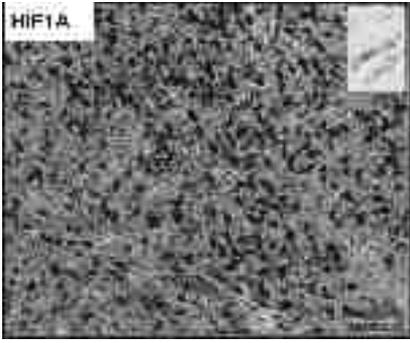
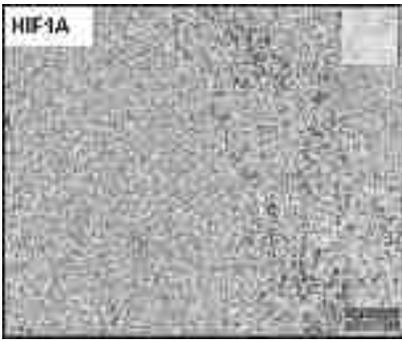
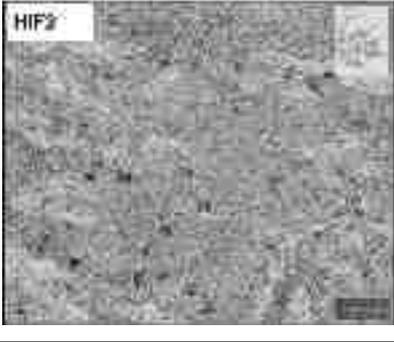
	Sarcomes d'Ewing	
	Marquage positif	Absence/ faible marquage
pS6RP		
p-mTOR		
HIF-1 α		
HIF2		

Figure 19 : Exemples de résultats en coloration immunohistochimique avec les différents marqueurs de l'hypoxie (p-mTOR, pS6RP, HIF-1 α , HIF-2). Barre d'échelle = 50 μ m (en bas à gauche de l'image)

4.1.2. Données globales d'immunohistochimie des marqueurs de l'hypoxie.

Marqueur d'hypoxie	N TOTAL	N négatifs	Min	Max	Q1	Q3	Med	Moy (DS)
p-mTOR	36	10/36	0%	100%	0%	57%	10%	29% (35,4%)
pS6RP	35	11/35	0%	99%	0%	76%	11%	34% (38,9%)
HIF1A	35	24/35	0%	40%	0%	2%	0%	6% (13%)
HIF2	36	5/36	0%	61%	1%	19%	6%	13% (17,3%)

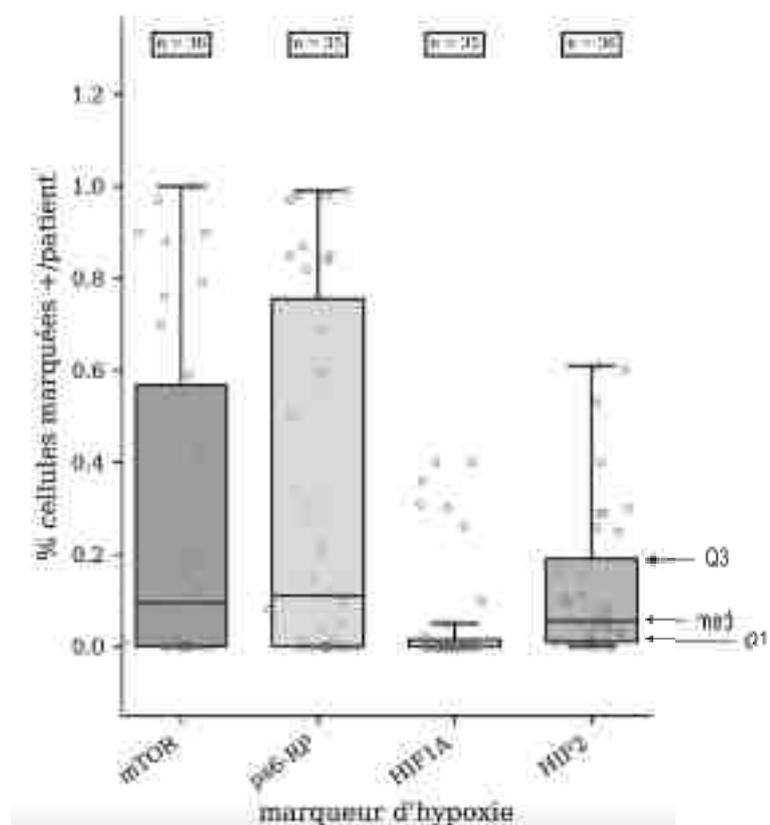


Figure 20 : Boxplots et tableau représentant la répartition dans la cohorte du pourcentage de cellules tumorales positives pour chaque marqueur : p-mTOR, pS6RP, HIF1A et HIF2.

Chaque indicateur d'hypoxie est lié à un nombre total de patients (N TOTAL) pour lesquels les lames ont pu être utilisées. La colonne "N négatifs" indique combien de patients présentaient 100% de cellules négatives pour chaque anticorps. Les données sont exprimées en pourcentage de cellules positives. Les statistiques fournies comprennent la médiane, les quartiles (Q1, Q3), ainsi que les valeurs minimales et maximales.

Concernant p-mTOR, les valeurs varient de 0% (minimum) à 100% (maximum), indiquant une grande variation dans les données. Le premier quartile montre qu'au moins 25% des échantillons ont une expression nulle de p-mTOR.

L'observation des données pour pS6RP montre également une grande dispersion des données.

Concernant HIF1A, les valeurs sont généralement très faibles, avec une moyenne de 6% et une médiane de 0%. La dispersion est faible, la majorité des valeurs sont proches de zéro, avec un maximum de 40% de cellules positives.

Concernant HIF2: La moyenne (13%) est légèrement supérieure à la médiane (6%), ce qui indique une légère asymétrie vers les valeurs plus élevées. Les valeurs varient de 0% (minimum) à 61% (maximum), montrant une certaine variation des données.

En résumé, ces statistiques révèlent la répartition des pourcentages de cellules positives pour chaque anticorps, avec des tendances spécifiques.

4.1.3. Test statistique de corrélation entre les marqueurs d'hypoxie et le décès/la rechute.

- Corrélation entre marqueur d'hypoxie et décès

L'ensemble des résultats décrits dans ce paragraphe sont résumés dans le tableau de la Figure 21.

Marqueur d'hypoxie étudié	Patients vivants (N total)	Patients décédés (N total)	p-Value
p-mTOR	0.23 (EIQ 0.71) N = 28	0.01 (EIQ 0.022)) N = 8	0.05
HIF2	0.055 (EIQ 0.23) N = 28	0.065 (EIQ 0.11) N = 8	0.62
HIF1	0.0 (EIQ 0.0) N = 27	0.015 (EIQ 0.15) N = 8	0.056
pS6RP	0.14 (EIQ 0.84) N = 28	0.01 (EIQ 0.19) N = 7	0.187

Figure 21 : Tableau de comparaison entre les groupes vivants/décédés pour les marqueurs d'hypoxie (Nombre total de patients dans chaque groupe =N). Les données fournies sont la médiane, l'Écart Interquartile (EIQ) et le degré de significativité (p). Elles sont exprimées en proportion de cellules positives/lame.

● Impact de p-mTOR sur le décès et la survie globale

Le pourcentage médian de cellules p-mTOR était significativement plus élevé chez les patients vivants, respectivement de 23% contre 1% chez les patients décédés (p= 0,05).

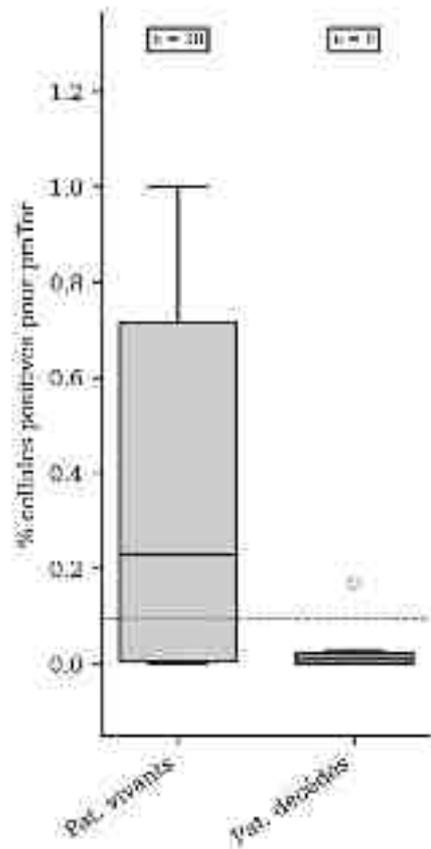


Figure 22 : Boxplot représentant le pourcentage de cellules positives pour p-mTOR chez les patients vivants à gauche (N=28) et chez les patients décédés à droite (N=8). Il est significativement plus élevé chez les patients vivants.

Comme nous avons trouvé une différence significative entre les patients vivants et décédés pour l'expression de p-mTOR, nous avons réalisé pour ce marqueur une analyse de survie dans notre cohorte.

Les patients qui présentaient un pourcentage de cellules marquées positives pour p-mTOR supérieur à 17% étaient considérés comme positifs (N=16). Les patients présentant un pourcentage de cellules positives inférieures au seuil étaient considérés négatifs (N=20) (Figure 23).

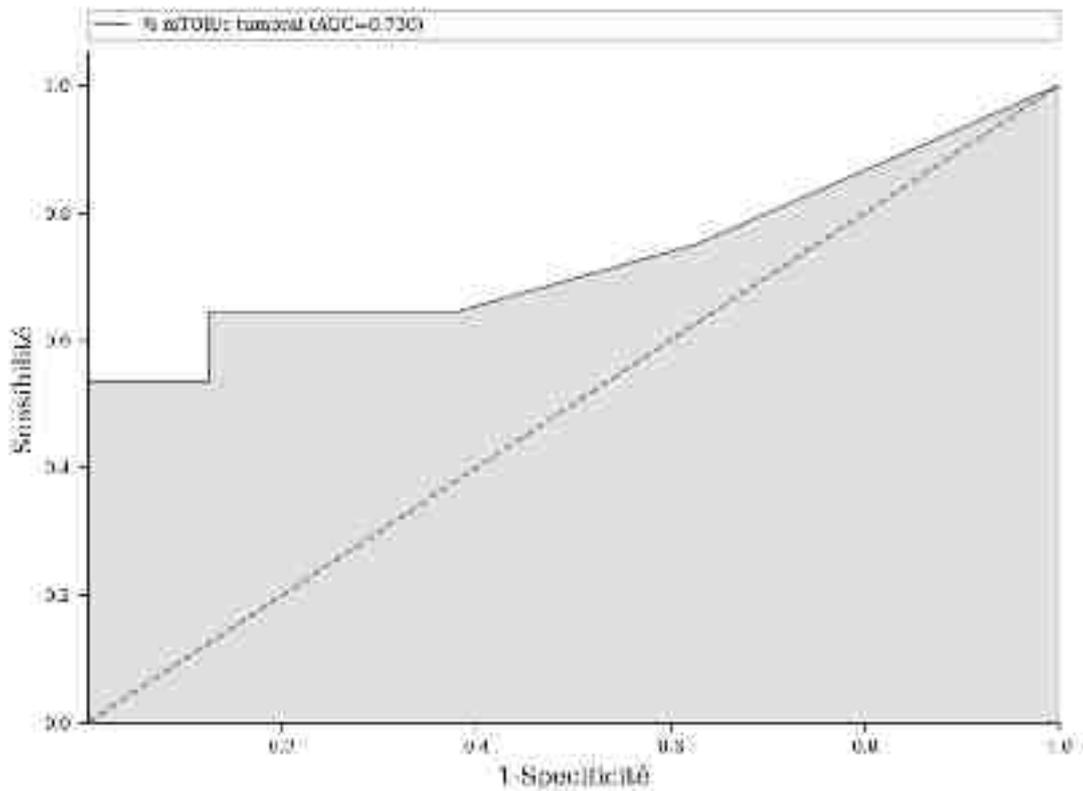


Figure 23 : Courbe ROC pour évaluer la capacité à prédire le décès en fonction du pourcentage de cellules p-mTOR positives tumorales.

L'aire sous la courbe était de 0,730 (IC 95 % : [0,571 ; 0,889]).

Nous avons trouvé un cut-off pour p-mTOR afin de discriminer les patients positifs et négatifs pour ce marqueur. Ce seuil a été fixé à 17% avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 54% selon Youden

L'analyse de survie globale (Figure 24) ne montrait aucune différence significative entre les patients avec une expression négative de p-mTOR et ceux avec une expression positive de p-mTOR (supérieure au seuil ROC calculé) ($p = 0,11$).

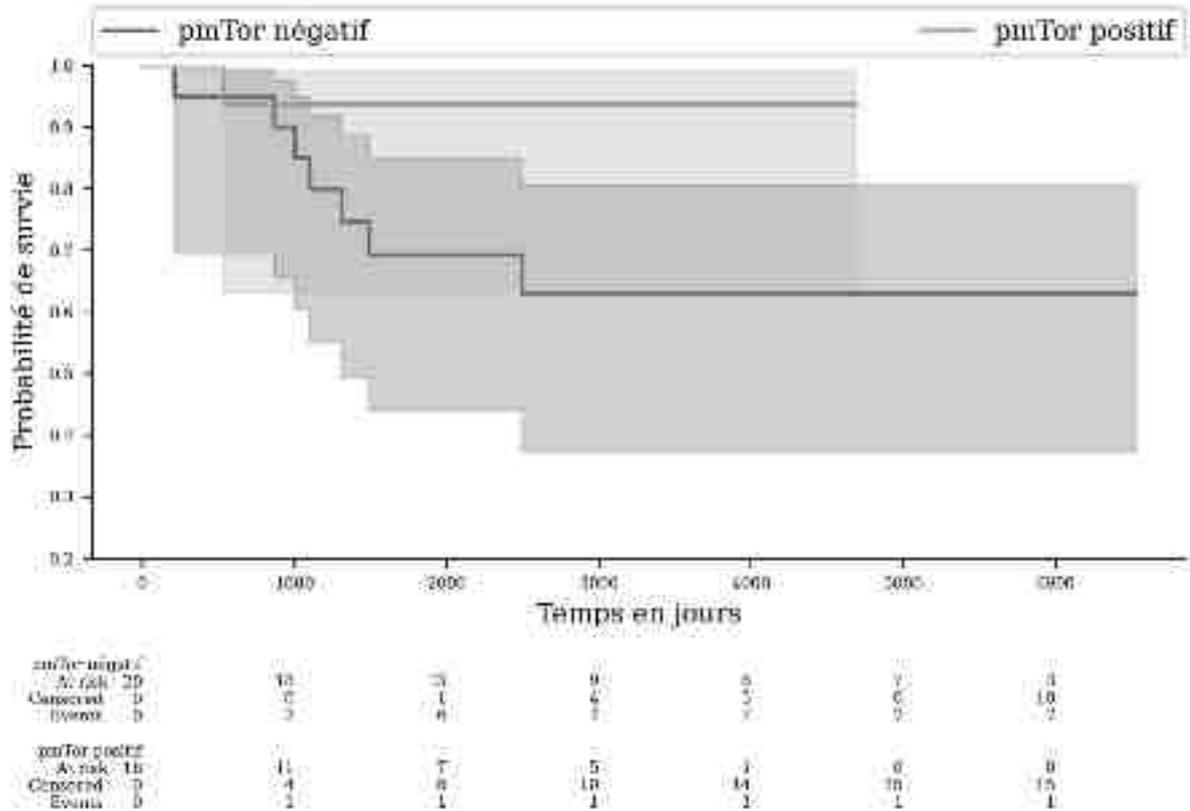


Figure 24 : Survie globale (OS) des patients en fonction de l'expression positive (supérieure au seuil ROC calculé) ou non de p-mTOR

À 5 ans, le taux de survie sans décès était de 69,3 % (IC à 95 % : 44,0-84,9) pour les patients considérés négatifs pour p-mTOR, et de 93,8 % (IC à 95 % : 63,2-99,1) pour ceux positifs pour p-mTOR.

À 10 ans, le taux de survie sans décès était de 63,0 % (IC à 95 % : 37,4-80,5) pour les patients négatifs pour p-mTOR, et de 93,8 % (IC à 95 % : 63,2-99,1) pour ceux à expression positive de p-mTOR.

- **Impact de pS6RP sur le décès**

La figure 21 révèle que, pour pS6RP, composante de la cascade en aval de mTor, on observe également une tendance à des niveaux plus élevés (38%) chez les patients survivants par rapport à ceux décédés (15,5%), bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative ($p=0,187$).

- **Impact de HIF1A sur le décès**

Le taux médian de cellules exprimant HIF1 était de 1,5% parmi les patients décédés (N=8), comparé à un taux médian de 0% parmi les patients encore en vie (N=27). Il est important de noter que bien que cette différence ne soit pas négligeable, elle n'a pas atteint une signification statistique ($p = 0,056$).

- **Impact de HIF2 sur le décès**

Aucune différence n'a été montrée entre les patients vivants et décédés pour HIF2 dans cette cohorte, comme l'indique la Figure 21.

- Impact des marqueurs d'hypoxie au diagnostic sur la rechute

Aucune différence significative n'a été observée en ce qui concerne le pourcentage de cellules marquées par les anticorps p-mTOR, HIF2, HIF1 et pS6RP entre les patients présentant une rechute ou non (Figure 25).

Variable	Absence de rechute (N total)	Présence de rechute (N total)	p-Value
p-mTOR	0.19 (EIQ 0.59) N = 21	0.02 (EIQ 0.3) N = 15	0.592
HIF2	0.04 (EIQ 0.16) N = 21	0.07 (EIQ 0.18) N = 15	0.735
HIF1	0.0 (EIQ 0.0) N = 21	0.0 (EIQ 0.08) N = 14	0.236
pS6RP	0.11 (EIQ 0.84) N = 21	0.15 (EIQ 0.55) N = 14	0.798

Figure 25 : Tableau de comparaison entre les groupes rechute et absence de rechute pour les marqueurs d'hypoxie (Nombre total de patients dans chaque groupe =N). Expression en proportion de cellules positives par lame avec médiane, EIQ et p.

4.1.4. Relation entre les données radiologiques, données cliniques, biologiques et immunohistochimiques.

- Corrélation avec données radiologiques

On note une corrélation significative négative entre le pourcentage de nécrose et l'expression de pS6RP ce qui signifie que lorsque le pourcentage de nécrose augmente, l'expression de pS6RP tend à diminuer ($\rho = -0,54$; $r^2 = 0,297$; $p = 0,007$).

Une tendance vers une association positive entre HIF1A et le pourcentage de nécrose est également indiquée ($p = 0,06$), ce qui signifie que lorsque le pourcentage de nécrose augmente, l'expression de HIF1A augmente également.

Variable	Corrélation	p	Corrélation	p	Corrélation	p	Corrélation	p
1. Nécrose (%)	0,000	0,000						
2. pS6RP (%)	-0,54	0,007						
3. HIF1A (%)	0,25	0,06						
4. pS6RP (p-value)	0,007	0,007						
5. HIF1A (p-value)	0,06	0,06						
6. Nécrose (p-value)	0,000	0,000						
7. pS6RP (p-value)	0,007	0,007						
8. HIF1A (p-value)	0,06	0,06						
9. Nécrose (p-value)	0,000	0,000						

Figure 26 : Tableau de corrélation entre les marqueurs radiologiques et hypoxiques au diagnostic. Données fournies: coefficient de corrélation Rho= ρ de Spearman, degré de significativité (p)

- **Corrélation avec le profil métastatique**

Aucune significativité n'a été notée concernant la proportion de cellules marquées par les anticorps p-mTOR, HIF2, HIF1 et pS6RP en fonction de la présence de métastases au diagnostic et ceux dont le cancer était localisé (Figure 27).

Variable	Absence de métastase (N total)	Présence de métastase(s) (N total)	p-Value
p-mTOR	0.03 (EIQ 0.44) N = 21	0.27 (EIQ 0.62) N = 15	0.455
HIF2	0.05 (EIQ 0.14) N = 21	0.06 (EIQ 0.19) N = 15	0.76
HIF1	0.0 (EIQ 0.01) N = 21	0.0 (EIQ 0.015) N = 14	0.902
pS6RP	0.21 (EIQ 0.82) N = 21	0.03 (EIQ 0.47) N = 14	0.383

Figure 27 : Tableau de comparaison pour les marqueurs d'hypoxie en fonction de la présence ou non de métastases au diagnostic (Nombre total de patients dans chaque groupe =N). Expression en proportion de cellules positives par lame avec médiane, EIQ et p.

- **Corrélation avec la localisation du primitif**

Variable	Primitif osseux (N total)	Primitif extra-osseux (N total)	p-Value
p-mTOR	0.025 (EIQ 0.28) N = 30	0.83 (EIQ 0.39) N = 6	0,01
HIF2	0.045 (EIQ 0.098) N = 30	0.29 (EIQ 0.21) N = 6	0,18
HIF1	0.0 (EIQ 0.05) N = 29	0.0 (EIQ 0.0) N = 6	0,3
pS6RP	0.1 (EIQ 0.69) N = 29	0.35 (EIQ 0.77) N = 6	0,705

Figure 28 : Tableau de comparaison pour les marqueurs d'hypoxie en fonction de la localisation du primitif au diagnostic (Nombre total de patients dans chaque groupe =N). Expression en proportion de cellules positives avec médiane, EIQ et p.

Le pourcentage médian de cellules mTOR positives était de 2,5% chez les patients qui avaient un primitif osseux et de 83% chez les patients pour lesquels qui avaient un primitif extra osseux (p=0,011). Cela signifie que les patients atteints de primitif osseux avaient un pourcentage de cellules positives pour mTOR beaucoup plus bas que ceux atteints de primitif extra osseux dans notre cohorte.

- Corrélation avec l'âge

Variable	Enfants (<18ans) (N total)	Adultes (>18ans) (N total)	p-Value
p-mTOR	0.16 (EIQ 0.67) N = 23	0.02 (EIQ 0.41) N = 13	0,474
HIF2	0.03 (EIQ 0.12) N =23	0.1 (EIQ 0.36) N = 13	0,047
HIF1A	0.0 (EIQ 0.04) N=22	0.0 (EIQ 0.01) N=13	0,96
pS6RP	0.15 (EIQ 0.83) N = 23	0.025 (EIQ 0.28) N = 12	0,125

Figure 29 : Tableau de comparaison des groupes en fonction du statut pédiatrique ou adulte au diagnostic pour chaque marqueur d'hypoxie. Les données fournies sont la médiane, l'Écart Interquartile (EIQ) et le degré de significativité (p).

Le pourcentage médian de cellules positives pour HIF2 était de 10% chez les patients adultes, tandis qu'il était de 3% chez les enfants, ce qui était significativement inférieur sur le plan statistique, avec une valeur de p égale à 0,047.

- Corrélation avec le taux de LDH

Variable		% mTOR/c tumoral	% HIF2/c tumoral	% HIF1/c tumoral	% pS6/c tumoral	LDH au DCN (U/L)
1. % mTOR/c tumoral	Spearman's rho	—	—	—	—	—
	p-value	—	—	—	—	—
2. % HIF2/c tumoral	Spearman's rho	0.391	—	—	—	—
	p-value	<0.001	—	—	—	—
3. % HIF1/c tumoral	Spearman's rho	-0.165	-0.054	—	—	—
	p-value	0.343	0.829	—	—	—
4. % pS6/c tumoral	Spearman's rho	0.587	0.248	0.179	—	—
	p-value	<.001	0.151	0.338	—	—
5. LDH au DCN (U/L)	Spearman's rho	-0.062	-0.271	-0.007	-0.458	—
	p-value	0.779	0.281	0.971	0.025	—

Figure 30 : Tableau de corrélation entre les marqueurs hypoxiques et taux de LDH (U/L) au diagnostic. Données fournies: coefficient de corrélation Rho= ρ de Spearman, degré de significativité (p)

Une corrélation négative statistiquement significative a été observée entre le taux LDH au moment du diagnostic (U/L) et le pourcentage de pS6RP. Cela signifie que lorsque le taux de LDH au moment du diagnostic augmente, le pourcentage de pS6RP tend à diminuer ($\rho = -0,46$; $r^2 = 0,046$; $p = 0,025$).

- **Corrélation avec les autres marqueurs d'hypoxie**

● **Corrélation entre p-mTOR et pS6RP**

Une corrélation a été mise en évidence entre le pourcentage de p-mTOR et le pourcentage de pS6RP ($\rho = 0,59$; $r^2 = 0,384$; $p < 0,001$). Dans ce cas, la corrélation (ρ) était modérée, avec un r^2 (r carré) qui signifie que 38,4 % de la variation dans le pourcentage de pS6RP peut être expliquée par le pourcentage de p-mTOR. Ici, $p < 0,001$, ce qui signifie que la corrélation est hautement significative.

En résumé, cela révèle qu'il existe une corrélation significative et positive de niveau modéré entre le pourcentage de p-mTOR et le pourcentage de pS6RP, indiquant que ces deux variables ont tendance à varier conjointement dans l'analyse statistique.

● **Corrélation entre p-mTOR et HIF2**

Une corrélation de faible niveau a été identifiée entre le pourcentage de mTOR et le pourcentage de HIF2 ($\rho = 0,39$; $r^2 = 0,099$; $p = 0,019$). Il y a une relation positive entre ces deux variables ($\rho = 0,39$) ce qui signifie que lorsque le pourcentage de mTOR augmente, le pourcentage de HIF2 a tendance à augmenter également, et inversement.

5. Biomarqueurs hypoxiques et macrophagiques étudiés par immunohistochimie et leurs corrélations cliniques.

5.1. Caractéristiques de l'infiltration macrophagique avec les marquages immunohistochimiques

Pour rappel nous avons étudié ici un marquage cytoplasmique de CD68 et CD163 à la fois dans les zones tumorales et les zones stromales.

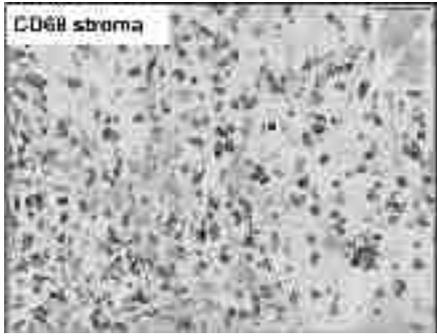
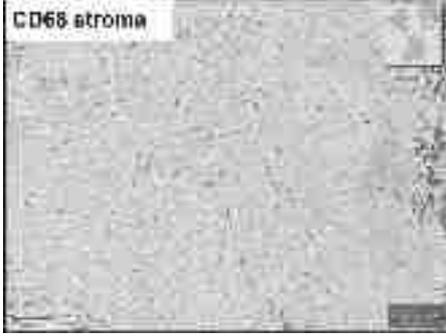
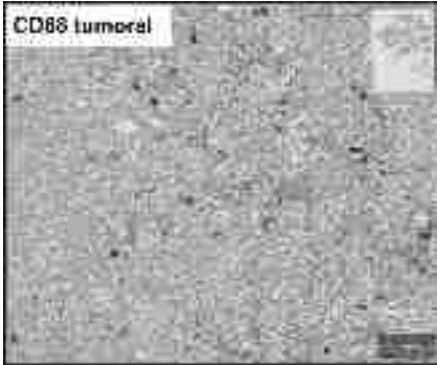
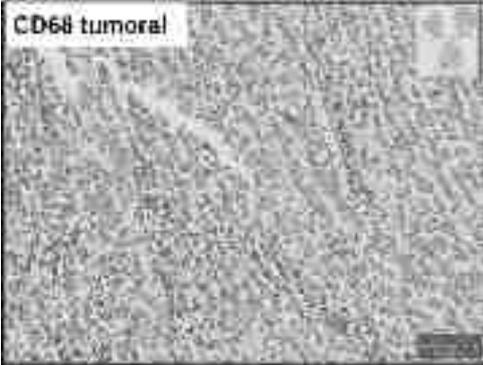
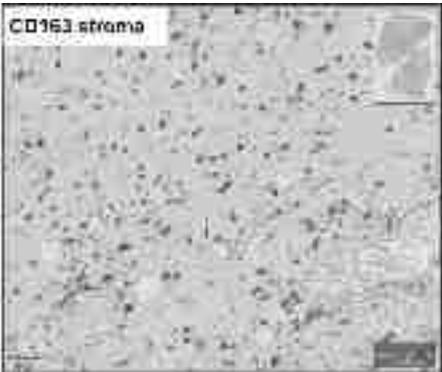
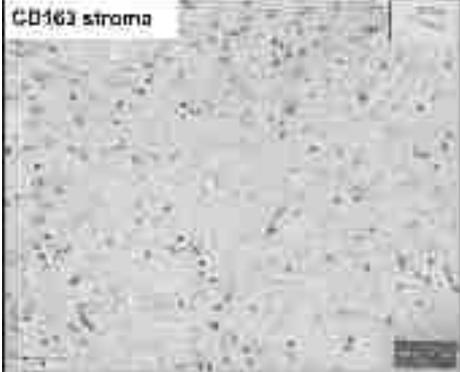
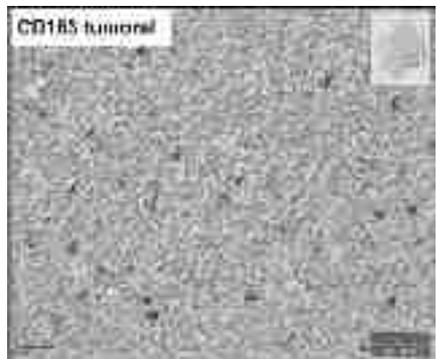
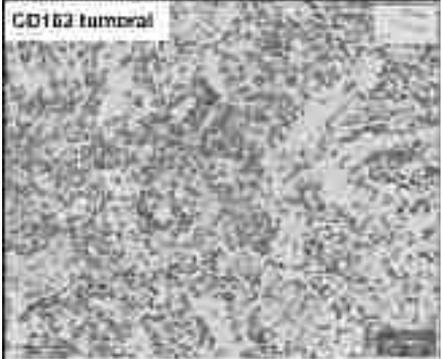
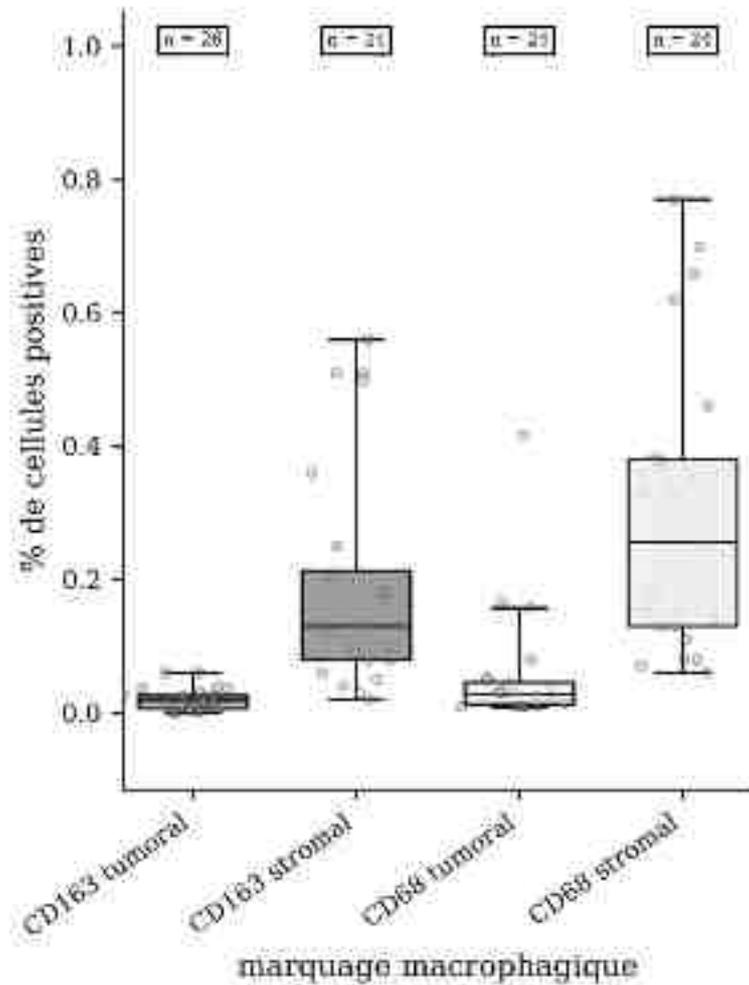
		Sarcomes d'Ewing	
		Marquage positif	Absence/ faible marquage
CD68			
			
CD163			
			

Figure 31 : Exemples de coloration immunohistochimique avec CD68 et CD163
Barre d'échelle = 50 μ m

L'infiltration de macrophages était principalement présente dans le tissu stromal, avec un rapport de cellules marquées stromales/tumorales moyen de 12,8 pour CD163 et de 11,6 pour CD68.

Nous avons pu analyser les données d'infiltration macrophagique chez 24 patients pour le marquage au CD68 et chez 26 patients pour le CD163.

Le nombre de cellules totales, incluant les cellules stromales et tumorales, marquées avec CD68 était en moyenne 2,8 fois plus élevé que le nombre de cellules marquées avec CD163.



Marqueurs macrophagiques	N total	N négatifs	Min (%)	Max (%)	Q1 (%)	Q3 (%)	Median (%)	Moyenne (SD) (%)
CD163/ tumoral	26	2	0	6	0,6	2,6	1,9	1,9 (1,7)
CD163/stroma	24	0	2	56	8	21,3	13	19,1 (16,8)
CD68/tumoral	24	0	0,8	41,6	1,3	4,6	2,9	5,4 (8,8)
CD68/stroma	24	0	6	77	13	38	25,5	30 (21,4)

Figure 32 : Boxplots et tableau représentant la répartition dans la cohorte de patients du pourcentage de cellules positives dans le stroma et dans le tissu tumoral pour les marqueurs CD68 et CD163.

Chaque marqueur macrophagique est associé au nombre total de patients (N TOTAL) pour lesquels les données ont pu être utilisées. La colonne "N négatifs" indique combien de patients présentaient 100% de cellules négatives pour chaque anticorps. Les données sont exprimées en pourcentage de cellules positives. Les statistiques fournies comprennent la médiane, les quartiles (Q1, Q3), les valeurs minimales et maximales ainsi que la moyenne avec sa dispersion (Déviation Standard ou DS).

5.2. Corrélations statistiques entre les pourcentages de macrophages M1 et M2 et les événements cliniques : décès, récurrence

5.2.1. Corrélation avec le décès

Marqueurs macrophagiques étudiés	Patients vivants N = 28	Patients décédés N = 8	p-Value
cellules CD163 + tumorales	0.019 (EIQ 0.026) N = 22	0.014 (EIQ 0.011) N = 4	0.803
cellules CD163 + stromales	0.13 (EIQ 0.14) N = 20	0.14 (EIQ 0.17) N = 4	0.485
cellules CD68 + tumorales	0.028 (EIQ 0.033) N = 20	0.026 (EIQ 0.048) N = 4	0.907
cellules CD68+ stromales	0.21 (EIQ 0.23) N = 20	0.38 (EIQ 0.17) N = 4	0.229

Figure 33 : Analyse comparative des marqueurs macrophagiques entre les groupes cliniques de patients vivants à long terme et les patients décédés. Les données sont exprimées en proportion de cellules positives/lame.

Dans le tissu tumoral, les pourcentages médians de CD163 et de CD68 étaient similaires entre les patients décédés et les patients vivants, avec des valeurs de p non significatives (CD163 : p = 0,803, CD68 : p = 0,907).

En ce qui concerne le stroma, les pourcentages médians de CD163 et de CD68 étaient également comparables entre les patients décédés et les patients vivants, et les différences observées n'étaient pas statistiquement significatives (CD163 : p = 0,485, CD68 : p = 0,229).

5.2.2. Corrélation avec la rechute

Il n'y avait aucune différence significative dans les pourcentages de cellules marquées avec CD68 (à la fois dans le stroma et la tumeur), ni avec CD163 (à la fois dans le stroma et la tumeur) entre les patients ayant ou non une rechute dans leur évolution.

Variable	Absence de rechute (N total)	Présence de rechute (N total)	p-Value
cellules CD163 + tumorales	0.022 (EIQ 0.033) N=16	0.017 (EIQ 0.013) N=10	0.712
cellules CD163 + stromales	0.12 (EIQ 0.25) N=14	0.15 (EIQ 0.092) N=10	0.558
cellules CD68 + tumorales	0.028 (EIQ 0.036) N = 14	0.026 (EIQ 0.027) N = 10	0.906
cellules CD68+ stromales	0,24 (EIQ 0,239) N = 14	0,25 (EIQ 0,235) N = 10	0.757

Figure 34 : Analyse comparative des marqueurs macrophagiques entre les groupes cliniques de patients ayant présenté une rechute et ceux indemnes de rechute.

5.3. Corrélation avec les autres données cliniques, radiologiques, d'hypoxie et macrophagiques.

5.3.1. Corrélation avec données radiologiques

Variable	Volume tumorale	Volume nécrose	Volume nécrose (%)					
1. CD163+ tumorales	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2. CD163+ stromales	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3. CD68+ tumorales	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4. CD68+ stromales	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5. CD163+ tumorales	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6. CD163+ stromales	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7. CD68+ tumorales	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
8. CD68+ stromales	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Figure 35 : Tableau de corrélation entre les marqueurs radiologiques et macrophagiques au diagnostic. Données fournies: coefficient de corrélation Rho= ρ de Spearman, degré de significativité (p)

Il n'y avait pas de corrélation statistiquement significative entre le volume tumoral, le volume de nécrose, le pourcentage de nécrose au diagnostic et le pourcentage de cellules marquées CD68+ ou CD163+, dans le stroma ou les zones tumorales.

5.3.2. Corrélation avec le profil métastatique

Chez les patients ayant des métastases au diagnostic : le pourcentage médian de cellules marquées CD68+ dans la zone tumorale était plus faible, mesuré à 1,3%, par rapport aux patients sans métastases, où il était de 4,4%. Cette différence était statistiquement significative, avec une valeur de p égale à 0,01.

Variable	Absence de métastase (N total)	Présence de métastase(s) (N total)	p-Value
cellules CD163 + tumorales	0.02 (EIQ 0.02) N = 15	0.016 (EIQ 0.019) N = 11	0.603
cellules CD163 + stromales	0.13 (EIQ 0.42) N = 13	0.13 (EIQ 0.095) N = 11	0.663
cellules CD68 + tumorales	0.044 (EIQ 0.06) N = 13	0.013 (EIQ 0.018) N = 11	0.01
cellules CD68+ stromales	0.18 (EIQ 0.27) N = 13	0.33 (EIQ 0.23) N = 11	0.384

Figure 36 : Comparaison des groupes en fonction du statut métastatique au diagnostic pour chaque variable macrophagique

5.3.3. Corrélation avec la localisation du primitif

Le pourcentage médian de cellules positives pour CD68 était de 34% chez les patients dont la tumeur primitive était osseuse, tandis qu'il était de 8% chez les patients qui avaient un primitif extra-osseux. Cette différence était statistiquement significative, avec une valeur de p égale à 0,003.

Variable	Primitif osseux (N total)	Primitif extra-osseux (N total)	p-Value
cellules CD163 + tumorales	0.019 (EIQ 0.022) N=20	0.014 (EIQ 0.016) N=6	0,76
cellules CD163 + stromales	0.12 (EIQ 0.097) N=18	0.21 (EIQ 0.36) N=6	0,548
cellules CD68 + tumorales	0.022 (EIQ 0.021) N=18	0.028 (EIQ 0.034) N=6	0,482
cellules CD68+ stromales	0.34 (EIQ 0.28) N=18	0.08 (EIQ 0.03) N=6	0,03

Figure 37 : Tableau de comparaison pour les marqueurs macrophagiques en fonction de la localisation du primitif au diagnostic (Nombre total de patients dans chaque groupe =N). Expression en proportion de cellules positives avec médiane, EIQ et p.

5.3.4. Corrélation avec l'âge

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre l'infiltration stromal ou tumoral en macrophages CD68 ou CD163 et l'âge pédiatrique ou adulte au diagnostic.

Variable	Enfants (<18ans) (N total)	Adultes (>18ans) (N total)	p-Value
cellules CD163 + tumorales	0,02 (EIQ 0,025) N=18	0,008 (EIQ 0,014) N=8	0,314
cellules CD163 + stromales	0.13 (EIQ 0.31) N=16	0.12 (EIQ 0.1) N=8	0.244
cellules CD68 + tumorales	0.026 (EIQ 0.048) N=16	0.029 (EIQ 0.021) N=8	0,951
cellules CD68+ stromales	0.3 (EIQ 0.38) N=16	0.21 (EIQ 0.2) N=8	0.624

Figure 38 : Tableau de comparaison des groupes en fonction du statut pédiatrique ou adulte au diagnostic pour chaque marqueur d'hypoxie. Les données fournies sont la médiane, l'Écart Interquartile (EIQ) et le degré de significativité (p).

5.3.5. Corrélation avec le taux de LDH

Variable		%CD68/c stroma	%CD68/c tumoral	%CD163/c stroma	%CD163/c tumoral	LDH au DCN (U/L)
1. %CD68/c stroma	Spearman's rho	—	—	—	—	—
	p-value	—	—	—	—	—
2. %CD68/c tumoral	Spearman's rho	0.429	—	—	—	—
	p-value	0.036	—	—	—	—
3. %CD163/c stroma	Spearman's rho	0.269	0.432	—	—	—
	p-value	0.269	0.046	—	—	—
4. %CD163/c tumoral	Spearman's rho	0.219	0.493	0.578	—	—
	p-value	0.199	0.019	0.003	—	—
5. LDH au DCN (U/L)	Spearman's rho	-0.184	-0.672	-0.425	-0.220	—
	p-value	0.311	0.006	0.114	0.395	—

Figure 39 : Tableau de corrélation entre les marqueurs macrophagiques et le taux de LDH (U/L) au diagnostic. Données fournies: coefficient de corrélation Rho= ρ de Spearman, degré de significativité (p)

Une corrélation négative modérée a été observée entre le pourcentage de cellules CD68 positives à l'intérieur de la tumeur et le taux de LDH au moment du diagnostic ($\rho=-0,67$; $r^2=0,032$; $p=0,006$). En d'autres termes, lorsque le nombre de cellules CD68 positives est élevé, le taux de LDH au diagnostic a tendance à être plus bas.

5.3.6. Corrélation avec les marqueurs d'hypoxie

Nous n'avons pas trouvé de corrélation significative entre les marqueurs d'hypoxie (ps6, HIF1A, HIF2, p-mTOR) et le pourcentage de macrophages positifs pour CD68 ou CD163 aux niveaux tumoral et stromal.

Variable		%CD68/c stroma	%CD68/c tumoral	%CD163/c stroma	%CD163/c tumoral	ps6/c stroma	ps6/c tumoral	HIF1A/c stroma	HIF1A/c tumoral	HIF2/c stroma	HIF2/c tumoral	p-mTOR/c stroma	p-mTOR/c tumoral
1. %CD68/c stroma	Spearman's rho	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	p-value	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2. %CD68/c tumoral	Spearman's rho	0.429	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	p-value	0.036	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3. %CD163/c stroma	Spearman's rho	0.269	0.432	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	p-value	0.269	0.046	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4. %CD163/c tumoral	Spearman's rho	0.219	0.493	0.578	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	p-value	0.199	0.019	0.003	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5. ps6/c stroma	Spearman's rho	-0.184	-0.672	-0.425	-0.220	—	—	—	—	—	—	—	—
	p-value	0.311	0.006	0.114	0.395	—	—	—	—	—	—	—	—
6. ps6/c tumoral	Spearman's rho	0.233	0.255	0.259	0.311	0.585	—	—	—	—	—	—	—
	p-value	0.226	0.285	0.285	0.288	0.040	—	—	—	—	—	—	—
7. HIF1A/c stroma	Spearman's rho	0.107	0.180	0.291	0.459	0.441	0.039	—	—	—	—	—	—
	p-value	0.455	0.180	0.180	0.040	0.040	0.003	—	—	—	—	—	—
8. HIF1A/c tumoral	Spearman's rho	-0.081	0.250	-0.181	-0.008	0.587	-0.176	0.248	—	—	—	—	—
	p-value	0.388	0.040	0.388	0.948	0.040	0.388	0.181	—	—	—	—	—

Figure 40 : Tableau de corrélation entre les marqueurs hypoxiques et macrophagiques au diagnostic. Données fournies: coefficient de corrélation Rho= ρ de Spearman, degré de significativité (p)

5.3.7 Corrélation avec les autres marqueurs macrophagiques

Nous avons identifié une relation positive entre le pourcentage de cellules CD68 présentes à l'intérieur de la tumeur et le pourcentage de cellules CD163 dans le stroma ($\rho = 0,41$; $r^2 = 0,016$; $p = 0,046$). De plus, une association positive a été mise en évidence entre le pourcentage de cellules CD163 dans la tumeur et le pourcentage de cellules CD163 dans le stroma ($\rho = 0,58$; $r^2 = 0,265$; $p = 0,003$). En d'autres termes, lorsque l'une de ces populations cellulaires augmente, l'autre a tendance à augmenter également.

Ces données sont résumées dans la Figure 38.

DISCUSSION

Les EWS sont des tumeurs agressives pour lesquelles il existe un besoin d'innovation thérapeutique et de marqueurs pronostiques au diagnostic utilisables pour adapter le traitement.

Les thérapies ciblées sont des pistes prometteuses mais nécessitent d'avoir des cibles présentes sur tous les sarcomes d'Ewing ou au minimum dans les formes à fort risque de rechute. En effet, viser l'oncogène de fusion EWS-FLI1 serait une cible idéale, mais cela présente des défis importants. Cette protéine possède une structure moléculaire complexe, ce qui rend difficile l'interaction avec de petites molécules. De plus, l'oncogène de fusion EWS-FLI1 ne présente pas d'activité enzymatique connue, sa régulation implique des mécanismes épigénétiques complexes, notamment au niveau des histones et des publications récentes ont montré la modulation de son expression au moment de la récurrence et de la progression qui ne permettrait pas de la cibler correctement (2,5).

Ainsi, dans notre étude, nous avons examiné de manière rétrospective l'expression de marqueurs associés aux voies hypoxiques (HIF1A, HIF2, phospho-s6-RP, et phospho-mTor) ainsi que des marqueurs du microenvironnement macrophagique (CD68 et CD163) dans des échantillons biologiques de patients atteints de tumeurs EWS au moment du diagnostic. Ces marqueurs peuvent devenir des cibles thérapeutiques au vu de l'arrivée de nouvelles molécules ciblant les mTor et les HIFs mais également les macrophages (exemple, les CAR-macrophages ou encore le Dinutuximab beta).

En parallèle, nous avons quantifié la nécrose tumorale à partir des images par résonance magnétique (IRM) obtenues au diagnostic de ces patients qui peut être le témoin radiologique d'une partie de l'hypoxie intratumorale présente au diagnostic. Notre objectif était de corrélérer ces données immunohistochimiques et radiologiques avec les données cliniques de survie, notamment la survie globale et la survie sans récurrence.

Nos résultats proviennent d'une cohorte de 36 patients, et leurs caractéristiques cliniques étaient en grande partie similaires à ce qui est décrit dans la littérature en termes d'âge de survenue, de sexe, de localisation initiale de la tumeur et de présence de métastases, ainsi que dans les approches thérapeutiques utilisées (2,26,27). Cependant, dans notre cohorte, nous avons observé une légère surreprésentation des cas métastatiques au moment du diagnostic, avec 15 patients sur 36, soit 41,7%, alors que la moyenne habituelle se situe entre 20 et 35%.

Un seul patient de notre cohorte avait des antécédents de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) B du nourrisson qui avait nécessité une allogreffe, ce qui est connu pour être associé au risque de développer ultérieurement une néoplasie secondaire, y compris un sarcome d'Ewing (28).

De plus, il convient de noter que le transcrit EWS-FLI1 était le plus courant, mais nous avons observé dans notre cohorte un taux plus élevé que dans la littérature du transcrit EWS-ERG (33,3%) (2). L'évolution de notre cohorte était en accord avec les résultats rapportés dans la littérature, montrant un taux de rechute d'environ 40%, principalement chez les patients ayant des métastases au moment du diagnostic. En ce qui concerne la survie sans événement (EFS), elle atteignait près de 50% à 5 ans, tandis que la survie globale (OS) était de 75% à 5 ans, ce qui correspond également aux données antérieures de la recherche scientifique (2,10).

Un taux élevé de LDH n'a pas été associé de manière négative à la survie, contrairement aux résultats de la méta-analyse réalisée par Li et al. (4). Il convient de noter que, à ce jour, il n'existe pas de seuil clairement défini pour ce critère. Cependant, nous avons observé que les patients métastatiques au moment du diagnostic, ceux en rechute, ainsi que ceux décédés avaient en général des taux de LDH plus élevés, bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative.

En ce qui concerne la méthode de délimitation des tumeurs, il était généralement plus difficile de contourer les tissus mous en raison du caractère non circonscrit et de l'infiltration diffuse des EWS, comparativement aux tumeurs localisées au niveau osseux. Cependant, grâce à la présence de coupes fines lors de l'IRM, il a été possible d'obtenir une évaluation relativement précise des volumes tumoraux et de la nécrose.

Il a été démontré qu'un volume tumoral supérieur à 200 ml était un facteur de mauvais pronostic au moment du diagnostic des EWS (26). Trois patients dans notre cohorte répondaient à ce critère, parmi lesquels un a connu une rechute, mais aucun n'est décédé. Une étude menée par Dunst et al. suggère que la présence de zones non perfusées (probablement nécrotiques) sur les images par résonance magnétique (IRM) de 79 patients atteints d'EWS au moment du diagnostic est associée à un risque accru de métastases, en particulier osseuses ou multiples. Cette observation pourrait s'expliquer par le comportement biologiquement plus agressif des cellules tumorales en situation d'hypoxie. Dunst et al. ont aussi montré qu'il existait une corrélation significative entre la taille de la tumeur et la présence de nécrose. Cependant, dans notre étude, nous disposons de données exploitables pour seulement 24 patients, et nous n'avons pas pu mettre en évidence de lien significatif entre la taille de la tumeur, la taille de la nécrose et le pourcentage de nécrose en relation avec l'évolution de nos patients. Cette limitation principale s'explique par la taille réduite de notre échantillon.

Les marqueurs d'hypoxie que nous avons étudiés comprenaient HIF1A, HIF2, pS6RP et p-mTOR. La technique et l'automatisation de leur détection constituent une nouveauté, offrant ainsi une approche plus systématisée qui peut être appliquée dans tous les centres pour des études, en suivant le principe de reproductibilité due à l'automatisation de la technique. Bien que l'importance de l'hypoxie dans le processus de progression des tumeurs ait fait l'objet d'analyses approfondies dans de nombreux types de cancer différents, nos connaissances actuelles et les caractéristiques spécifiques de l'hypoxie et de sa signalisation dans les EWS n'ont pas encore été systématiquement explorées (5,29).

Nos résultats montrent que le pourcentage médian de cellules p-mTOR était significativement plus élevé chez les patients vivants, respectivement de 23% contre 1% chez les patients décédés ($p = 0,05$). L'activation de p-mTOR peut avoir un effet inhibiteur sur la voie de l'IGF1R impliqué dans la croissance tumorale et la réponse à l'hypoxie (30). Cela peut avoir des implications dans la régulation de la croissance et de la survie cellulaires, ainsi que dans la réponse aux traitements ciblant l'IGF1R. Les EWS ont été particulièrement sensibles à cette thérapeutique dans les études de phase I déjà réalisées (29,31).

Aussi, une corrélation statistiquement positive a été mise en évidence entre un pourcentage élevé de l'expression de p-mTOR et le pourcentage d'expression élevé de pS6RP dans cette cohorte ($\rho = 0,59$; $r^2 = 0,384$; $p < 0,001$). En effet, mTor phosphoryle pS6RP, ce qui active la traduction de gènes spécifiques et favorise la croissance cellulaire en amont des deux marqueurs HIFs. En conséquence, lorsque mTor est inhibé en réponse à l'hypoxie, la phosphorylation de pS6RP diminue et inversement. Cette corrélation entre l'absence probable d'hypoxie en cas de positivité de p-mTOR peut également se retrouver dans la significativité statistique entre le pourcentage faible de nécrose tumorale et la présence d'une expression positive de pS6RP. De plus, même si nous n'avons de significativité statistique, les survies globales et sans récurrences semblent meilleures en cas d'expression positive de p-mTOR dans notre cohorte. Ceci est probablement dû comme déjà discuté au nombre limité de patients de notre étude.

Dans notre cohorte, 24/35 patients n'exprimaient pas HIF1A. Lorsqu' il était exprimé, une moyenne de 6% des cellules de la lame étaient positives. Nous avons trouvé une tendance entre un pourcentage de cellules positives pour HIF1A plus important parmi les patients décédés comparé aux patients encore en vie ($p = 0,056$), ce qui corrobore avec l'étude de Ceranski et al.

D'autre part, Stahl et ses collègues ont observé une association entre la présence de HIF1 α et une augmentation des cellules immunitaires de type macrophages M2 et neutrophiles, ainsi qu'une réduction des lymphocytes T de pronostic favorable. Cependant, dans notre propre étude, nous n'avons pas pu démontrer de manière significative une corrélation entre l'expression des macrophages et HIF1A, bien que les coefficients de corrélation positifs suggèrent une possible association entre HIF1A et l'abondance des macrophages.

Du point de vue de la thérapeutique, il est essentiel de prendre en compte ces considérations, car il est possible de cibler l'activation de la voie mTOR et de la voie du facteur induisible par l'hypoxie (HIF)-1 α à l'aide de médicaments spécifiques : le rapamycine pour mTOR et l'irinotécan pour HIF-1 α .(31,32)

Les marqueurs macrophagiques que nous avons étudiés comprenaient CD68 et CD163, qui sont respectivement le marqueur de macrophages M1 (phénotype dit pro-inflammatoire) et le marqueur de macrophage M2 (phénotype dit pro-tumoral) .

Bien que les marqueurs CD68 et CD163 soient principalement associés aux macrophages, il convient de noter que dans certaines conditions pathologiques ou contextes spécifiques, d'autres types de cellules (monocytes, cellules dendritiques) peuvent également exprimer ces marqueurs, bien que de manière moins fréquente et à des niveaux généralement plus faibles. Il est important de souligner que nous n'avons pas effectué un comptage exhaustif des macrophages ni une analyse spatiale, car notre approche était principalement orientée vers une évaluation préliminaire.

Il semble que la grande majorité des patients inclus dans l'étude exprimaient à la fois CD68 et CD163, à la fois dans le stroma et dans la tumeur elle-même. La prédominance des cellules positives pour CD68 indique que ces macrophages sont particulièrement abondants dans le microenvironnement, ce qui est cohérent avec l'idée que les macrophages sont présents de manière généralisée dans les tumeurs d'Ewing (EWS) (22).

Nos résultats montrent que les niveaux d'expression des marqueurs macrophagiques dans le tissu tumoral et le stroma ne différaient pas de manière significative entre les patients décédés et les patients vivants, ainsi qu'entre les patients ayant fait une rechute et ceux qui n'ont pas connu de rechute.

Cependant chez les patients atteints de métastases, le pourcentage médian de cellules marquées CD68+ dans la zone tumorale était plus faible, mesuré à 1,3%, par rapport aux patients sans métastases, où il était de 4,4%. Cette différence était statistiquement significative, avec une valeur de p égale à 0,01 et peut expliquer l'importance de cette immunité pro-inflammatoire ou anti-tumorale dans l'extension métastatique à distance des EWS.

Nous n'avons pas trouvé de corrélation significative entre un marquage CD163 positif et le décès, la rechute ou la présence de métastases. Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) dits pro-tumoraux le plus souvent CD163+ (CD68 négatifs) jouent un rôle clé en influençant l'inflammation, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et l'ostéoclastogenèse lors du développement des EWS. La présence accrue de TAMs est déclenchée par la libération de VEGF par l'EWS, et cette augmentation est renforcée par les cytokines et chimiokines produites par les TAMs elles-mêmes, entraînant une inflammation dans l'EWS. Les TAMs favorisent également la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins dans la tumeur en stimulant la production de VEGF par les cellules tumorales, ce qui pourrait avoir un impact sur l'apparition de métastases. (33)

Dans une étude, menée par Fujiwara et al, un total de 41 échantillons d'EWS ont été analysés pour évaluer la signification pronostique de l'expression de CD68 dans les macrophages. Les résultats indiquaient que des taux accrus de macrophages exprimant CD68 étaient associés à une survie globale moins favorable ce qui semble différent de notre cohorte. (33)

Dans une seconde étude réalisée par Handl et ses collaborateurs sur 23 patients atteints de EWS, une corrélation a été observée entre les macrophages positifs pour CD163 et le diagnostic de maladie localisée, ce que nous n'avons pas mis en évidence dans notre petite population de patients. (34)

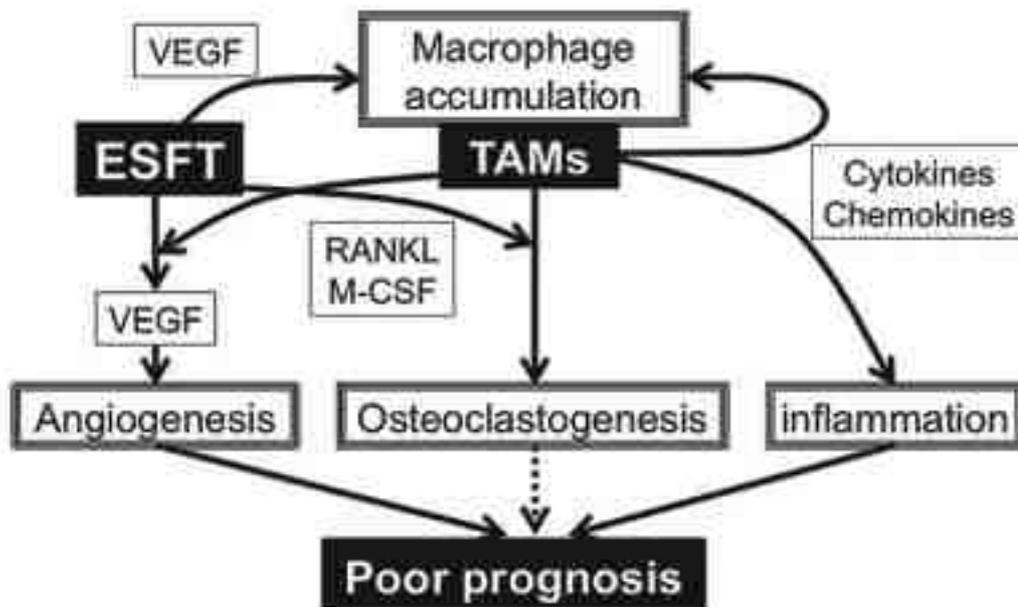


Figure 8. Model for TAM-mediated modulation of EWS microenvironment.

Figure 41 : Modèle de modulation du microenvironnement tumoral par les TAMs dans les EWS.(Fujiwara & al., extrait de The American Journal of Pathology, 2011)

L'interaction entre l'hypoxie, les cellules tumorales d'Ewing et les macrophages n'a pas trouvé de corrélation statistiquement significative dans notre étude. Cependant, il y a de fortes présomptions pour que l'hypoxie influence la réponse immunitaire en attirant les macrophages vers la tumeur. La polarisation des macrophages vers des phénotypes spécifiques peut entraîner des conséquences variées sur la progression de la tumeur, allant de la promotion de la croissance tumorale à une réponse immunitaire antitumorale. Le petit nombre de patients que nous avons inclus dans cette étude est probablement la principale limite pour avoir des corrélations significatives.

Certains signaux immunitaires inhibiteurs présents dans le microenvironnement tumoral pourraient notamment être vecteurs de résistance aux nouvelles thérapies immunitaires, notamment les CAR-T anti GD2 qui se développent et actuellement en essai dans les EWS. GD2 est une molécule fortement présente dans le EWS et est détectée à différents stades de la maladie, y compris lors de rechutes. Elle représente une cible potentielle pour les thérapies immunitaires, telles que les lymphocytes T CAR-T, conçus pour la cibler spécifiquement. Cette recherche de marquage pourrait probablement compléter notre criblage protéique à la recherche de marqueur immunitaire afin de proposer d'autres approches thérapeutiques.

Dans l'ensemble, notre étude est novatrice, avec des résultats potentiellement applicables dans la pratique clinique sur les biopsies diagnostiques, sous réserve de confirmation dans une cohorte plus large en nombre de patients. En effet, il convient de noter que notre échantillon était de petite taille, avec seulement 36 cas, ce qui s'explique par la rareté de la maladie. En ce qui concerne nos perspectives futures, un plus large nombre de patients permettrait par exemple une analyse multivariée. Il serait intéressant d'examiner la répartition spatiale des marqueurs dans les tissus et d'envisager une corrélation des marqueurs étudiés avec l'étude d'autres marqueurs de l'immunité macrophagique et cytotoxique qu'est par exemple le GD2.

CONCLUSION

Nous avons collecté des données rétrospectives en analysant l'expression de marqueurs liés aux voies hypoxiques (HIF1A, HIF2, phospho-s6-RP, et phospho-mTor) ainsi que des marqueurs du microenvironnement macrophagique (CD68 et CD163) à partir de biopsies prélevées lors du diagnostic de sarcome d'Ewing. Notre approche, qui explore l'interaction étroite entre l'hypoxie et le microenvironnement tumoral, ouvre la voie à de potentielles améliorations théranostiques dans le traitement des sarcomes d'Ewing.



VU et approuvé
Strasbourg, le **29 AOUT 2023**
Le Doyen de la Faculté de
Médecine, Médecine et Sciences de la Santé

Professeur Jean SIBILLA

VU
Strasbourg, le **21/08/2023**
Le président du jury de thèse

Professeur C. PALLARD



Professeur Catherine PALLARD
Chef de Service
HÔPITAL UNIVERSITAIRE DE STRASBOURG
Hôpital de Hautecroix
Circus - Hématologie Pédiatrique
Service de Pédiatrie 3 - Greffe de moelle osseuse
Avenue Molière - 67000 STRASBOURG Cedex
Tél. : 03 88 12 83 91 - Fax : 03 88 12 80 02
Site : www.hopital.univ-strasbourg.fr
N° ICPPS : 1000917227

ANNEXES

Annexe 1 : Protocole résumé d'immunomarquage pour chaque anticorps

Protocole résumé			
Procédure: U ultraView DAB (v1.02.0018)			
BenchMark ULTRA IHC/ISH			
CHU HAUTEPIERRE STRASBOURG, 1 AVENUE MOLIÈRE 67000 STRASBOURG			
Protocole N°	Nom du protocole	Version	Date de création
03	CD45 - ISH	1	02/02/2018 16:42:18
1	Tripathotype (Sélectionné)		
2	Chauffage des lames jusqu'à 72 Deg C à partir de Température initiale (Décolorifique)		
3	Cell Conditioning (Sélectionné)		
4	ULTRA Conditioner #1 (Sélectionné)		
5	Chauffe la lame à 33 Deg C et incuber 5 Minutes (avec temps CCT) (Cell Conditioning #1)		
6	25 minutes d'ULTRA CC1 (Sélectionné)		
7	35 minutes d'ULTRA CC1 (Sélectionné)		
8	Anticorps (Sélectionné)		
9	Déposer une goutte de PREP KIT (IS) (Anticorps), Appliquer Cover slip, et incuber (3 Heures 33 Min)		
10	Coloré coloration (Sélectionné)		
11	Déposer une goutte de HEMATOXYLIN (S) (Contre coloration), Appliquer Cover slip, et incuber (5 Minutes)		

Protocole résumé			
Protocole N°	Nom du protocole	Version	Date de création
04	CD45 - IHC	1	02/02/2018 16:42:18
1	Chaperonage (Sélectionné)		
2	Chauffage des lames jusqu'à 72 Deg C à partir de Température initiale (Décolorifique)		
3	Cell Conditioning (Sélectionné)		
4	ULTRA Conditioner #1 (Sélectionné)		
5	Chauffe la lame à 33 Deg C et incuber 5 Minutes (avec temps CCT) (Cell Conditioning #1)		
6	35 minutes d'ULTRA CC1 (Sélectionné)		
7	35 minutes d'ULTRA CC1 (Sélectionné)		
8	Anticorps (Sélectionné)		
9	Déposer une goutte de PREP KIT (IS) (Anticorps), Appliquer Cover slip, et incuber (3 Heures 33 Min)		
10	Coloré coloration (Sélectionné)		
11	Déposer une goutte de HEMATOXYLIN (S) (Contre coloration), Appliquer Cover slip, et incuber (5 Minutes)		

Protocole N°	Nom du protocole	Version	Date de création
101	Protocole 101	1	17/03/2021 14:42:02
<ol style="list-style-type: none"> Déparasitage (Sélectionné) Chauffage des lames jusqu'à 72 Deg C) à partir de Température moyenne (Déparasitage) Cell Conditioning (Sélectionné) ULTRA Conditioner #1 (Sélectionné) Chauffer la lame à 80 Deg C), et Incuber 4 Minutes (avec temps CC1 (Cell Conditioning #1)) 20 minutes d'ULTRA CC1 (Sélectionné) 35 minutes d'ULTRA CC1 (Sélectionné) Température (Incubation de l'anticorps (Sélectionné)) Clonage et chauffage pendant l'incubation de l'anticorps (Mixed read) Anticorps (Sélectionné) Déposer une goutte de (PYRO KIT TR) (Anticorps), Appliquer Cover slip, et Incuber (3 Heurs 30 Min) Contrôle de qualité (Sélectionné) Déposer une goutte de (HEMATOCYLINE R) (Contrôle de qualité), Appliquer Cover slip, et Incuber (3 Minutes) 			

Protocole N°	Nom du protocole	Version	Date de création
102	Protocole 102	1	20/03/2021 16:28:16
<ol style="list-style-type: none"> Déparasitage (Sélectionné) Chauffage des lames jusqu'à 77 Deg C) à partir de Température moyenne (Déparasitage) Cell Conditioning (Sélectionné) ULTRA Conditioner #1 (Sélectionné) Chauffer la lame à 80 Deg C), et Incuber 5 Minutes (avec temps CC1 (Cell Conditioning #1)) 20 minutes d'ULTRA CC1 (Sélectionné) 35 minutes d'ULTRA CC1 (Sélectionné) Titrage (Sélectionné) Head Apply (Anticorps Primary), and incubate for (3 Heurs 30 Min) Contrôle de qualité (Sélectionné) Déposer une goutte de (HEMATOCYLINE R) (Contrôle de qualité), Appliquer Cover slip, et Incuber (3 Minutes) 			

Protocole N°	Nom du protocole	Version	Date de création
103	Protocole 103	1	20/03/2021 15:47:40
<ol style="list-style-type: none"> Déparasitage (Sélectionné) Chauffage des lames jusqu'à 77 Deg C) à partir de Température moyenne (Déparasitage) Cell Conditioning (Sélectionné) ULTRA Conditioner #1 (Sélectionné) Chauffer la lame à 80 Deg C), et Incuber 5 Minutes (avec temps CC1 (Cell Conditioning #1)) 20 minutes d'ULTRA CC1 (Sélectionné) 35 minutes d'ULTRA CC1 (Sélectionné) Titrage (Sélectionné) Head Apply (Anticorps Primary), and incubate for (3 Heurs 30 Min) Contrôle de qualité (Sélectionné) Déposer une goutte de (HEMATOCYLINE R) (Contrôle de qualité), Appliquer Cover slip, et Incuber (3 Minutes) 			

Protocole N°	Nom du protocole	Version	Date de création
104	Protocole 104	1	20/03/2021 15:50:01
<ol style="list-style-type: none"> Déparasitage (Sélectionné) Chauffage des lames jusqu'à 72 Deg C) à partir de Température moyenne (Déparasitage) Cell Conditioning (Sélectionné) ULTRA Conditioner #1 (Sélectionné) Chauffer la lame à 80 Deg C), et Incuber 5 Minutes (avec temps CC1 (Cell Conditioning #1)) 20 minutes d'ULTRA CC1 (Sélectionné) 35 minutes d'ULTRA CC1 (Sélectionné) Titrage (Sélectionné) Head Apply (Anticorps Primary), and incubate for (3 Heurs 30 Min) Contrôle de qualité (Sélectionné) Déposer une goutte de (HEMATOCYLINE R) (Contrôle de qualité), Appliquer Cover slip, et Incuber (3 Minutes) 			

BIBLIOGRAPHIE

1. Ewing J. Classics in oncology. Diffuse endothelioma of bone. James Ewing. Proceedings of the New York Pathological Society, 1921. *CA Cancer J Clin.* 1972 Mar-Apr;22(2):95-8. doi: 10.3322/canjclin.22.2.95. PMID: 4622125.
2. Riggi N, Suvà ML, Stamenkovic I. Ewing's Sarcoma. *N Engl J Med.* 2021 Jan 14;384(2):154-164. doi: 10.1056/NEJMra2028910. PMID: 33497548.
3. Gustave Roussy [En ligne]. Sarcome d'Ewing | Gustave Roussy ; [cité le 8 oct 2023]. Disponible : <https://www.gustaveroussy.fr/fr/sarcome-ewing>
4. Li S, Yang Q, Wang H, Wang Z, Zuo D, Cai Z, Hua Y. Prognostic significance of serum lactate dehydrogenase levels in Ewing's sarcoma: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol.* 2016 Dec;5(6):832-838. doi: 10.3892/mco.2016.1066. Epub 2016 Oct 27. PMID: 28105365; PMCID: PMC5228491.
5. Zöllner SK, Amatruda JF, Bauer S, Collaud S, de Álava E, DuBois SG, Harges J, Hartmann W, Kovar H, Metzler M, Shulman DS, Streitbürger A, Timmermann B, Toretsky JA, Uhlenbruch Y, Vieth V, Grünewald TGP, Dirksen U. Ewing Sarcoma-Diagnosis, Treatment, Clinical Challenges and Future Perspectives. *J Clin Med.* 2021 Apr 14;10(8):1685. doi: 10.3390/jcm10081685. PMID: 33919988; PMCID: PMC8071040.
6. Daniel, A., Jr.; Ullah, E.; Wahab, S.; Kumar, V., Jr. Relevance of MRI in prediction of malignancy of musculoskeletal system—a prospective evaluation. *BMC Musculoskelet. Disord.* 2009, 10, 125.
7. Sbaraglia M, Righi A, Gambarotti M, Dei Tos AP. Ewing sarcoma and Ewing-like tumors. *Virchows Arch.* 2020 Jan;476(1):109-119. doi: 10.1007/s00428-019-02720-8. Epub 2019 Dec 4. PMID: 31802230.
8. Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM, Ambros PF, Sheer D, Turc-Carel C, Triche TJ, et al. The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med.* 1994 Aug 4;331(5):294-9. doi: 10.1056/NEJM199408043310503. PMID: 8022439.
9. Anderton J, Moroz V, Marec-Bérard P, Gaspar N, Laurence V, Martín-Broto J, Sastre A, Gelderblom H, Owens C, Kaiser S, Fernández-Pinto M, Fenwick N, Evans A, Strauss S, Whelan J, Wheatley K, Brennan B. International randomised controlled trial for the treatment of newly diagnosed EWING sarcoma family of tumours - EURO EWING 2012 Protocol. *Trials.* 2020 Jan 17;21(1):96. doi: 10.1186/s13063-019-4026-8. PMID: 31952545; PMCID: PMC6969439.
10. Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, et al. Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. *J Clin Oncol* 2000; 18:3108-14.
11. Dunst J, Ahrens S, Paulussen M, Burdach S, Jürgens H. Prognostic impact of tumor perfusion in MR-imaging studies in Ewing tumors. *Strahlenther Onkol.* 2001 Mar;177(3):153-9. doi: 10.1007/s00066-001-0804-8. PMID: 11285773.
12. Petrova V, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G, Amelio I. The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis.* 2018 Jan 24;7(1):10. doi: 10.1038/s41389-017-0011-9. PMID: 29362402; PMCID: PMC5833859.

13. Ceranski AK, Carreño-Gonzalez MJ, Ehlers AC, Colombo MV, Cidre-Aranaz F, Grünewald TGP. Hypoxia and HIFs in Ewing sarcoma: new perspectives on a multi-faceted relationship. *Mol Cancer*. 2023 Mar 13;22(1):49. doi: 10.1186/s12943-023-01750-w. PMID: 36915100; PMCID: PMC10010019.
14. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*. 2010 Feb 4;29(5):625-34. doi: 10.1038/onc.2009.441. Epub 2009 Nov 30. PMID: 19946328; PMCID: PMC2969168.
15. El-Naggar AM, Veinotte CJ, Cheng H, Grunewald TG, Negri GL, Somasekharan SP, Corkery DP, Tirode F, Mathers J, Khan D, Kyle AH, Baker JH, LePard NE, McKinney S, Hajee S, Bosiljic M, Leprivier G, Tognon CE, Minchinton AI, Bennewith KL, Delattre O, Wang Y, Dellaire G, Berman JN, Sorensen PH. Translational Activation of HIF1 α by YB-1 Promotes Sarcoma Metastasis. *Cancer Cell*. 2015 May 11;27(5):682-97. doi: 10.1016/j.ccell.2015.04.003. PMID: 25965573.
16. Hawkins AG, et al. Microenvironmental Factors Drive Tenascin C and Src Cooperation to Promote Invadopodia Formation in Ewing Sarcoma. *Neoplasia*. 2019;21:1063–72.
17. Krook MA, et al. Stress-induced CXCR4 promotes migration and invasion of ewing sarcoma. *Mol Cancer Res MCR*. 2014;12:953–64.
18. Schmid T, Zhou J, Brüne B. HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med*. 2004 Oct-Dec;8(4):423-31. doi: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00467.x. PMID: 15601571; PMCID: PMC6740063.
19. Bárdos JI, Ashcroft M. Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling: Review articles. *BioEssays*. 2004;26:262–9.
20. Pierrelvecin M, Fuchs Q, Lhermitte B, Messé M, Guérin E, Weingertner N, Martin S, Lelong-Rebel I, Nazon C, Dontenwill M, Entz-Werlé N. Focus on Hypoxia-Related Pathways in Pediatric Osteosarcomas and Their Druggability. *Cells*. 2020 Aug 31;9(9):1998. doi: 10.3390/cells9091998. PMID: 32878021; PMCID: PMC7564372.
21. Cancer cell and macrophage cross-talk in the tumor microenvironment. Nathalie Dehne
22. Stahl Prognostic profiling of the immune cell microenvironment in Ewing's Sarcoma Family of Tumors
23. Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A. *et al.* QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 7, 16878 (2017).
24. Seminerio I, Kindt N, Descamps G, Bellier J, Lechien JR, Mat Q, Pottier C, Journé F, Saussez S. High infiltration of CD68+ macrophages is associated with poor prognoses of head and neck squamous cell carcinoma patients and is influenced by human papillomavirus. *Oncotarget*. 2018 Jan 24;9(13):11046-11059. doi: 10.18632/oncotarget.24306. PMID: 29541395; PMCID: PMC5834277.
25. Wang X, Wang J, Zhao J, Wang H, Chen J, Wu J. HMGA2 facilitates colorectal cancer progression via STAT3-mediated tumor-associated macrophage recruitment. *Theranostics*. 2022 Jan 1;12(2):963-975. doi: 10.7150/thno.65411. PMID: 34976223; PMCID: PMC8692921.
26. Gaspar N, Hawkins DS, Dirksen U, Lewis IJ, Ferrari S, Le Deley MC, Kovar H, Grimer R, Whelan J, Claude L, Delattre O, Paulussen M, Picci P, Sundby Hall K, van den Berg H, Ladenstein R, Michon J, Hjorth L, Judson I, Luksch R, Bernstein ML, Marec-Bérard P, Brennan B, Craft AW, Womer RB, Juergens H, Oberlin O. Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 20;33(27):3036-46. doi: 10.1200/JCO.2014.59.5256. Epub 2015 Aug 24. PMID: 26304893.

27. Eaton BR, Claude L, Indelicato DJ, Vatner R, Yeh B, Schwarz R, Laack N. Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2021 May;68 Suppl 2:e28355. doi: 10.1002/pbc.28355. PMID: 33818887.
28. Yavvari S, Makena Y, Sukhavasi S, Makena MR. Large Population Analysis of Secondary Cancers in Pediatric Leukemia Survivors. *Children (Basel)*. 2019 Nov 29;6(12):130. doi: 10.3390/children6120130. PMID: 31795500; PMCID: PMC6956149.
29. Casey DL, Lin TY, Cheung NV. Exploiting Signaling Pathways and Immune Targets Beyond the Standard of Care for Ewing Sarcoma. *Front Oncol*. 2019 Jun 19;9:537. doi: 10.3389/fonc.2019.00537. PMID: 31275859; PMCID: PMC6593481.
30. Yi YW, You KS, Park JS, Lee SG, Seong YS. Ribosomal Protein S6: A Potential Therapeutic Target against Cancer? *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 21;23(1):48. doi: 10.3390/ijms23010048. PMID: 35008473; PMCID: PMC8744729.
31. Jannier S, Kemmel V, Sebastia Sancho C, Chammas A, Sabo AN, Pencreach E, Farace F, Chenard MP, Lhermitte B, Georger B, Aerts I, Frappaz D, Leblond P, André N, Ducassou S, Corradini N, Bertozzi AI, Guérin E, Vincent F, Velten M, Entz-Werle N. SFCE-RAPIRI Phase I Study of Rapamycin Plus Irinotecan: A New Way to Target Intra-Tumor Hypoxia in Pediatric Refractory Cancers. *Cancers (Basel)*. 2020 Oct 20;12(10):3051. doi: 10.3390/cancers12103051. PMID: 33092063; PMCID: PMC7656302.
32. Reita D, Bour C, Benbrika R, Groh A, Pencreach E, Guérin E, Guenot D. Synergistic Anti-Tumor Effect of mTOR Inhibitors with Irinotecan on Colon Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2019 Oct 17;11(10):1581. doi: 10.3390/cancers11101581. PMID: 31627299; PMCID: PMC6826690.
33. Fujiwara T, Fukushi J, Yamamoto S, Matsumoto Y, Setsu N, Oda Y, Yamada H, Okada S, Watari K, Ono M, Kuwano M, Kamura S, Iida K, Okada Y, Koga M, Iwamoto Y. Macrophage infiltration predicts a poor prognosis for human ewing sarcoma. *Am J Pathol*. 2011 Sep;179(3):1157-70. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.034. Epub 2011 Jul 21. PMID: 21771572; PMCID: PMC3157220.
34. Handl M, Hermanova M, Hotarkova S, Jarkovsky J, Mudry P, Shatokhina T, Vesela M, Sterba J, Zambo I. Clinicopathological correlation of tumor-associated macrophages in Ewing sarcoma. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2018 Mar;162(1):54-60. doi: 10.5507/bp.2017.049. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29170560.

DÉCLARATION SUR L'HONNEUR

DÉCLARATION SUR L'HONNEUR



Document avec signature originale devant être joint :

- à votre mémoire de D.E.S.
- à votre dossier de demande de soutenance de thèse

Nom : Pacaud Prénom : Camille

Ayant été informé(e) qu'en m'appropriant tout ou partie d'une œuvre pour l'intégrer dans mon propre mémoire de spécialité ou dans mon mémoire de thèse de docteur en médecine, je me rendrais coupable d'un délit de contrefaçon au sens de l'article L335-1 et suivants du code de la propriété intellectuelle et que ce délit était constitutif d'une fraude pouvant donner lieu à des poursuites pénales conformément à la loi du 23 décembre 1901 dite de répression des fraudes dans les examens et concours publics,

Ayant été avisé(e) que le président de l'université sera informé de cette tentative de fraude ou de plagiat, afin qu'il saisisse la juridiction disciplinaire compétente,

Ayant été informé(e) qu'en cas de plagiat, la soutenance du mémoire de spécialité et/ou de la thèse de médecine sera alors automatiquement annulée, dans l'attente de la décision que prendra la juridiction disciplinaire de l'université

J'atteste sur l'honneur

Ne pas avoir reproduit dans mes documents tout ou partie d'œuvre(s) déjà existante(s), à l'exception de quelques brèves citations dans le texte, mises entre guillemets et référencées dans la bibliographie de mon mémoire.

A écrire à la main : « J'atteste sur l'honneur avoir connaissance des suites disciplinaires ou pénales que j'encours en cas de déclaration erronée ou incomplète ».

Signature originale :

À Strasbourg, le 9 juillet 2023

Photocopie de cette déclaration devant être annexée en dernière page de votre mémoire de D.E.S. ou de Thèse.

RÉSUMÉ

Introduction :

Le sarcome d'Ewing (EWS) est une tumeur rare et agressive des os et tissus mous. Le contrôle de la maladie lorsqu'elle est récurrente ou disséminée est médiocre avec les thérapies actuelles. De ce fait, il y a un besoin crucial de trouver de nouvelles approches thérapeutiques. Pour cela, on s'intéresse à trouver une signature hypoxique et macrophagique en lien avec la survie.

Matériel et méthode :

Sur la base de données de sarcome d'Ewing diagnostiqués en oncologie pédiatrique et adulte de 2003 à 2022, 36 patients ont été référés aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg pour une prise en charge oncologique et chirurgicale. Ces patients ont des données cliniques, de traitement, radiologiques et des données moléculaires diagnostiques. Ces données permettront d'effectuer des corrélations avec la détection des marqueurs immunohistochimiques suivants : CD163, CD68, HIF1, HIF2, pS6RP, pmTOR. L'hypothèse est d'identifier des signatures immunohistochimiques impactant sur le pronostic et l'évolution des patients suivis pour sarcome d'Ewing.

Résultats : La durée médiane du suivi était de 8 ans (1-17). À 5 ans, l'OS était de 78,2 % (IC à 95 % : 59,5-89,0), l'EFS était de 57,8 % (IC 95 % : 39,1-72,7). Les données radiologiques ne montraient pas de différence significative en lien avec le décès ni la rechute. Le pourcentage médian de cellules p-mTOR était significativement plus élevé chez les patients vivants, respectivement de 23% contre 1% chez les patients décédés ($p=0,05$). Les survies globales et sans récurrences semblaient meilleures en cas d'expression positive de p-mTOR dans notre cohorte. Il n'y avait aucune différence significative dans les pourcentages de cellules marquées positivement pour les marqueurs d'hypoxie ou macrophagique et la présence ou non d'une rechute dans l'évolution des patients.

Conclusion :

Nous avons collecté des données rétrospectives en analysant l'expression de marqueurs liés aux voies hypoxiques (HIF1A, HIF2, phospho-s6-RP, et phospho-mTor) ainsi que des marqueurs du microenvironnement macrophagique (CD68 et CD163) à partir de biopsies prélevées lors du diagnostic de sarcome d'Ewing. Notre approche, qui explore l'interaction étroite entre l'hypoxie et le microenvironnement tumoral, ouvre la voie à de potentielles améliorations thérapeutiques dans le traitement des sarcomes d'Ewing.

Rubrique de classement : Onco-hématologie pédiatrique

Mots clés : Sarcome d'Ewing – Survie – Biomarqueurs – Immunohistochimie – Hypoxie – Macrophage – IRM – Microenvironnement tumoral

Président : Pr PAILLARD Catherine

Assesseurs : Professeur ENTZ-WERLE Natacha - Dr FATTORI Antonin - Dr GANTZER Justine - Dr NAZON Charlotte

Adresse de l'auteur : Camille Pacaud, 18 rue Schweighaeuser, 67000 STRASBOURG