

---

## Thesis, COLLÉGIALITÉ, FRANZEN Rachelle

**Auteur** : Gray, Erin

**Promoteur(s)** : Munaut, Carine

**Faculté** : Faculté de Médecine

**Diplôme** : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

**Année académique** : 2024-2025

**URI/URL** : <http://hdl.handle.net/2268.2/23255>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement  
Professeurs Agnès NOEL et Didier CATALDO

# Impact de l'inhibition de la voie S1P sur la progression de l'adénomyose et ses mécanismes cellulaires

---

Erin GRAY

Promoteur : Professeur Carine MUNAUT

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de

**Master en Sciences Biomédicales**

Année académique 2024-2025

---

# REMERCIEMENTS

---

En préambule de ce travail, je souhaite exprimer toute ma gratitude à celles et ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à son aboutissement.

En premier lieu, je tiens à remercier chaleureusement Madame Agnès Noël et Monsieur Didier Cataldo pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et permis d'y réaliser ce mémoire.

Ma reconnaissance s'adresse également à ma promotrice, Madame Carine Munaut, pour son accueil bienveillant et sa confiance ainsi que pour le temps précieux qu'elle m'a consacré tout au long de ce parcours, tant dans la réalisation que dans la rédaction de ce mémoire.

Je remercie, avec une attention toute particulière, Marlyne Squatrito, qui m'a encadrée du début à la fin de ce mémoire. Elle m'a appris de nombreuses techniques avec patience, m'a soutenue dans les moments de doute et surtout m'a permis de gagner rapidement en autonomie, une compétence que j'estime précieuse pour l'avenir.

Mes remerciements s'adressent également à tous les technologues de laboratoire pour leurs précieux conseils, et particulièrement à Émilie Feyereisen, Isabelle Dasoul et Silvia Blacher sans qui les analyses histologiques n'auraient pas pu être intégrées de manière aussi pertinente dans ce travail.

Je suis particulièrement reconnaissante envers mes parents et ma sœur, qui m'ont offert un soutien sans faille tout au long de ce travail et durant ces cinq années d'étude. Leurs présences et leurs mots réconfortants lors des moments difficiles m'ont été d'un grand secours.

Je tiens aussi à adresser un grand merci à mon copain qui, depuis deux ans et demi, me soutient avec beaucoup de patience. Merci d'avoir toujours été là pour me rassurer dans les périodes de stress, et ce plusieurs fois par jour s'il le fallait. Merci de m'avoir accompagnée même quand j'étais (un peu) difficile à suivre.

Enfin, je souhaite terminer par un remerciement qui me tient particulièrement à cœur, merci à Marine Jadoul, Lisa Gils et Erin Vieuxtemps d'avoir été là tout au long de ces cinq mois de mémoire, d'avoir été mes confidentes et surtout mes amies. J'ai eu beaucoup de chance de pouvoir partager cette expérience avec vous, dans un esprit de soutien mutuel. A tous ces rires, ces temps de midi mais aussi ces galères partagées ensemble, je vous souhaite plein de réussites pour la suite.

---

---

# **Résumé / Abstract**

---

---

---

# RÉSUMÉ

---

L'adénomyose est une affection gynécologique fréquente qui se caractérise par l'invasion du myomètre par du tissu endométrial, provoquant dysménorrhée, ménorragies et infertilité. En l'absence de traitement curatif autre que l'hystérectomie, l'exploration de nouvelles approches thérapeutiques est essentielle. Ce mémoire étudie le ciblage de la voie du sphingosine-1-phosphate (S1P), impliquée dans l'inflammation, la fibrose, l'angiogenèse et la migration cellulaire.

Deux inhibiteurs de la voie du S1P ont été évalués dans un modèle murin d'adénomyose : le FTY720, modulant les récepteurs S1PRs, et le SKI-5C, inhibiteur de l'enzyme SPHK1 responsable de la synthèse du S1P. Le FTY720, administré précocement, réduit significativement la progression des lésions et leur pénétration dans le muscle utérin. Le SKI-5C, quant à lui, démontre une efficacité en phase tardive.

Au niveau moléculaire, les deux composés modulent différemment l'expression de gènes impliqués dans les processus pathologiques, en fonction du moment d'administration. Par ailleurs, les études *in vitro* sur lignées cellulaires endométriales humaines confirment que le S1P active plusieurs voies de signalisation, notamment dans les cellules épithéliales, et révèlent des effets contrastés des inhibiteurs sur la prolifération cellulaire : inhibiteur pour FTY720, paradoxalement stimulant pour SKI-5C.

Ces données soulignent le potentiel d'un ciblage thérapeutique de la voie S1P à deux stades distincts de la maladie. Des études complémentaires, incluant notamment des modèles cellulaires plus complexes, seront nécessaires pour confirmer et affiner cette stratégie.

---

# ABSTRACT

---

Adenomyosis is a common gynecological condition characterized by the invasion of endometrial tissue into the myometrium, leading to dysmenorrhea, menorrhagia, and infertility. As hysterectomy remains the only curative option, exploring novel therapeutic approaches is essential. This thesis investigates the potential of targeting the sphingosine-1-phosphate (S1P) pathway, which is involved in inflammation, fibrosis, angiogenesis, and cell migration.

Two inhibitors were evaluated in a murine model of adenomyosis: FTY720, which modulates S1P receptors (S1PRs), and SKI-5C, which inhibits the SPHK1 enzyme responsible for S1P synthesis. FTY720, when administered early, significantly reduces lesion progression and invasion into the uterine muscle. SKI-5C, in contrast, shows efficacy at a later disease stage.

At the molecular level, both compounds differentially modulate the expression of genes involved in pathological processes, depending on the timing of administration. In parallel, *in vitro* studies on human endometrial cell lines confirm that S1P activates several signaling pathways, particularly in epithelial cells, and reveal contrasting effects of the two inhibitors on cell proliferation: inhibitory for FTY720, and paradoxically stimulatory for SKI-5C.

These findings highlight the therapeutic potential of targeting the S1P pathway at distinct stages of disease progression. Further studies, including more complex cellular models, are needed to confirm and refine this strategy.

---

# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1. L'adénomyose : une pathologie gynécologique fréquente .....	1
1.1. Définition et prévalence .....	1
1.2. Symptômes et impact clinique .....	1
2. Bases physiologiques nécessaires à la compréhension de la pathologie .....	2
2.1. Rappels anatomiques et fonctionnels chez l'humain .....	2
2.2. Particularités de l'utérus chez la souris et intérêt du modèle murin.....	2
3. Mécanismes physiopathologiques .....	4
3.1. Hypothèses étiopathogéniques .....	4
3.2. Lien avec l'endométriose : .....	5
4. Mécanismes de développement et de progression de la pathologie : .....	6
5. Diagnostic .....	7
6. Approches thérapeutiques actuelles .....	7
6.1. Traitements hormonaux .....	7
6.2. Traitements non hormonaux .....	8
6.3. Traitements radiologiques : .....	8
6.4. Traitements chirurgicaux .....	9
6.5. Limites des traitements existants .....	9
7. La voie du SIP : .....	9
7.1. Intérêt de la voie du SIP dans les pathologies utérines .....	10
7.2. Métabolisme du sphingosine-1-phosphate .....	10
7.3. Rôle physiologique du sphingosine-1-phosphate : .....	12
7.4. La possible implication de la voie du SIP dans l'adénomyose : .....	13
7.5. Les potentiels mécanismes pathologiques activés par le SIP : .....	14
7.6. Ciblage thérapeutique de la voie du SIP : .....	15
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>16</b>
<b>MANIPULATIONS <i>IN VIVO</i> : .....</b>	<b>16</b>
1. Modèle murin : .....	16
1.1. Induction de l'adénomyose : .....	16
1.2. Traitements avec les inhibiteurs : .....	16
2. Immunofluorescence : .....	17
2.1. Quantification : .....	18
3. Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne : .....	18
3.1. Extraction des ARNs: .....	18
3.2. Transcription inverse : .....	19
3.3. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel : .....	19
3.4. Quantification des ARNm suite à la PCR : .....	20
<b>MANIPULATIONS <i>IN VITRO</i> : .....</b>	<b>21</b>
1. Lignées cellulaires utilisées : .....	21

2.	Test de confluence : .....	21
3.	RT-qPCR : .....	21
4.	Test de prolifération : .....	21
4.1.	Ensemencement : .....	21
4.2.	Test de prolifération CyQUANT : .....	22
5.	Test de migration : .....	22
<b>OBJECTIFS .....</b>		<b>24</b>
<b>RESULTATS.....</b>		<b>25</b>
<b>ÉTUDES <i>IN VIVO</i>.....</b>		<b>25</b>
1.	Analyse histologique du modèle murin .....	25
1.1.	Description du modèle .....	25
1.2.	Comparaison de l'atteinte des utérus en fonction des modèles d'intervention .....	25
2.	Profil d'expression génique .....	27
2.1.	Marqueurs de l'inflammation (Cox2, IL6, MCP1, TNFa, IL10) .....	27
2.2.	Marqueurs de la migration et angiogenèse (uPA, VEGF, MMP2) .....	28
2.3.	Marqueurs de fibrose (Col1, Col3, TGFb).....	28
2.4.	Marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse (Snai1) : .....	29
<b>ÉTUDES <i>IN VITRO</i> .....</b>		<b>30</b>
1.	Détermination de la dose optimale de S1P .....	30
2.	Analyse de l'expression des acteurs de la voie S1P dans les deux lignées cellulaire (hESC et 12z) : ..	30
3.	Effet du S1P (100nM) sur l'expression des gènes cibles de la voie du S1P : .....	31
3.1.	Expression des enzymes de synthèse et de dégradation (SPHKs, SGPPs et SGPL) .....	31
3.2.	Expression des récepteurs S1PRs : .....	31
4.	Évaluation des inhibiteurs FTY720 et SKI-5C <i>in Vitro</i> .....	32
4.1.	Impact sur la prolifération cellulaire (test CyQUANT) .....	32
5.	Impact sur la migration cellulaire (Scratch Wound Assay) .....	33
5.1.	Effets dose-dépendants des inhibiteurs sur la migration cellulaire .....	33
5.2.	Modulation de l'expression de TIMP2 et uPA après traitement.....	33
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>		<b>34</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>		<b>41</b>

---

# LISTE DES ABRÉVIATIONS :

---

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ADNc : ADN désoxyribonucléique complémentaire
- AINS : Anti-Inflammatoires non stéroïdiens
- Ang1 : Angiopoïétine 1
- ApoM : Apolipoprotéine M
- ARN : Acide ribonucléique
- ARNm : Acide ribonucléique messenger
- C1P : Céramide-1-phosphate
- COCs : Contraceptifs oraux combinés
- Col1 : Collagène de type 1
- Col3 : Collagène de type 3
- ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- EpCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule
- FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting
- FITC : Fluorescéine isothiocyanate
- FTY720 : Fingolimod
- GAPDH : Glycéraldéhyde-3-Phosphate déshydrogénase
- GnRH : Gonadotropin-releasing hormone
- HDAC : Histone désacétylase
- hESC : Human endometrial stromal cells
- HIFU : High intensity focused ultrasound
- HRP : Horse radish peroxidase
- IL6 : Interleukine 6
- IL10 : Interleukine 10
- IHC : Immunohistochimie
- IRM : Imagerie par résonance magnétique
- MeOAc : Méthyl-acétate
- MCP1 : Monocyte chemoattractant protein 1
- MMP2 : Matrix metalloproteinase 2
- PMA : Procréation médicalement assistée
- RPLP0 : Ribosomal protein lateral stalk subunit P0
- SIU : Système intra-utérin
- SKI-5C : Inhibiteur de la SPHK1

- S1P : Sphingosine-1-Phosphate
- S1PR1–5 : Récepteurs de la Sphingosine-1-Phosphate 1 à 5
- SPHK1/2 : Sphingosine kinase 1 et 2
- SGPL : Sphingosine-1-Phosphate lyase
- SGPP1/2 : Sphingosine-1-Phosphate phosphatase 1 et 2
- SPNS2 : Spinster homologue 2 (transporteur de S1P)
- TGF- $\beta$  : Transforming growth factor beta
- TIMP2 : Tissue inhibitor of metalloproteinases 2
- TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor Alpha
- TSA : Tyramide signal amplification
- TVS : Transvaginal sonography
- UAE : Uterine artery embolization
- uPA : Urokinase plasminogen activator

---

---

# **Introduction**

---

---

---

# INTRODUCTION

---

## 1. L'adénomyose : une pathologie gynécologique fréquente

### 1.1. Définition et prévalence

L'adénomyose est une affection bénigne de l'utérus caractérisée par la présence de glandes endométriales et de stroma au sein du myomètre, la couche musculaire de l'utérus. Ces lésions sont généralement entourées de cellules musculaires hypertrophiées, traduisant une désorganisation locale du tissu utérin. L'invagination du tissu glandulaire endométrial dans la couche musculaire perturbe l'architecture normale de l'utérus et altère sa fonction contractile. L'adénomyose est une pathologie évolutive, souvent observée chez les femmes en âge de procréer. Sa prévalence est estimée à environ 20 % dans cette population, cependant, ce chiffre peut varier en fonction des critères de diagnostic utilisés et des groupes étudiés. Cette fréquence relativement élevée souligne l'importance d'un dépistage adapté et d'une meilleure compréhension de ses mécanismes.

Bien qu'elle soit bénigne, l'adénomyose peut se développer progressivement et affecter la fonction utérine, particulièrement sous l'influence des œstrogènes qui stimulent la croissance du tissu glandulaire au sein du myomètre. <sup>1</sup>

On distingue deux formes principales : l'adénomyose focale, caractérisée par des lésions localisées, et l'adénomyose diffuse, dans laquelle les lésions sont réparties de manière plus homogène dans le myomètre. D'un point de vue histologique, une classification en trois grades a été mise en place, celle-ci tient compte de la profondeur d'infiltration ; atteinte du premier tiers du myomètre (Grade I), atteinte des deux-tiers du myomètre (Grade II), atteinte de la totalité du myomètre (Grade III). <sup>2</sup>

### 1.2. Symptômes et impact clinique

L'adénomyose est souvent associée à la dysménorrhée (douleurs menstruelles intenses), des ménorragies (pertes menstruelles abondantes) et, dans certains cas, une dyspareunie (douleurs persistantes lors de rapports sexuels). Cependant, cette maladie semble être asymptomatique chez environ une femme sur trois. L'intensité des symptômes varie en fonction du degré d'atteinte du myomètre, du caractère local ou diffus des lésions ou encore de la présence d'une maladie concomitante comme l'endométriose. <sup>3</sup> L'adénomyose est aussi suspectée d'être à l'origine de problèmes de fertilité. Plusieurs études ont montré que les femmes atteintes d'adénomyose présentent des taux d'implantation embryonnaire et de grossesses évolutives réduits et ce, même en ayant recours à une insémination artificielle assistée. <sup>4</sup> Une méta-analyse menée par *Vercellini et al.* <sup>5</sup> a révélé que le taux de grossesses menées à terme chez les femmes atteintes d'adénomyose était de 40,5 % contre 49,8 % chez celles ne présentant aucune anomalie utérine. Par ailleurs, d'autres études ont mis en évidence un impact encore plus significatif de l'adénomyose sur la fertilité, rapportant une baisse de 30 à 50 % des chances de

mener une grossesse à terme après insémination artificielle, en fonction du degré de sévérité de la pathologie.<sup>6</sup>

## **2. Bases physiologiques nécessaires à la compréhension de la pathologie**

### **2.1. Rappels anatomiques et fonctionnels chez l'humain**

L'utérus est un organe musculaire creux situé dans la région pelvienne basse chez les femmes. Il comprend trois parties principales : le col utérin (ou cervix), qui fait la jonction avec le vagin ; l'isthme, ou zone de transition ; et le corps utérin, de forme triangulaire relié aux trompes de Fallope qui acheminent l'ovule fécondé depuis les ovaires.<sup>7</sup> (**Fig. 1.A**)

D'un point de vue histologique, l'utérus comprend trois couches : l'endomètre (muqueuse), le myomètre (couche musculaire) et le péritoine (séreuse). L'endomètre est la zone anatomique de l'utérus qui subit le plus de changements au cours de la vie d'une femme. Celui-ci se régénère environ 400 fois durant la vie d'une femme. Il est capable de se remodeler avant, pendant et après une grossesse ainsi que de se dégrader pour ensuite se reconstruire à chaque période menstruelle. Il comprend une couche basale, permanente, qui contient notamment des cellules épithéliales progénitrices, et une couche fonctionnelle, qui se renouvelle à chaque cycle menstruel et contient des cellules glandulaires, stromales, immunitaires et vasculaires.<sup>8</sup> Le myomètre joue un rôle clé dans l'évacuation de la couche fonctionnelle de l'endomètre pendant les menstruations ainsi que dans le transport du sperme, grâce à des contractions rythmiques, appelées contractions péristaltiques, qui favorisent la circulation des fluides à l'intérieur de la cavité utérine. La zone de jonction utérine (JZ) qui correspond au tiers interne du myomètre est riche en fibres musculaires et se distingue par sa sensibilité hormonale.<sup>9</sup> Elle exprime différemment les récepteurs aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PR) selon les phases du cycle menstruel, à l'inverse de la couche externe. Les myocytes y sont disposés de manière dense et ordonnée, optimisant leur efficacité contractile.<sup>10</sup> La JZ intervient activement dans le péristaltisme utérin, un phénomène de contractions musculaires facilitant le transport du sperme vers la cavité utérine ainsi que l'élimination de la couche fonctionnelle de l'endomètre lors des menstruations.<sup>11</sup> Ce processus est initié par l'ocytocine, qui agit via ses récepteurs OTR. L'expression de ces récepteurs est elle-même régulée par les œstrogènes via les récepteurs ER $\alpha$ , soulignant ainsi l'influence hormonale sur l'activité contractile de l'utérus.<sup>12</sup>

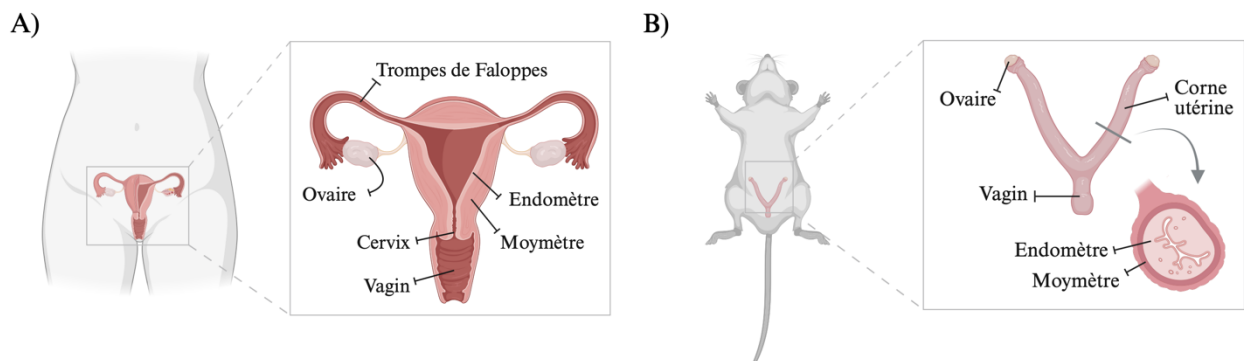
### **2.2. Particularités de l'utérus chez la souris et intérêt du modèle murin**

Chez la souris, l'utérus est de type bicorne, composé de deux cornes utérines tapissées d'endomètre, reliées aux ovaires. Cette structure permet d'accueillir plusieurs embryons simultanément (**Fig. 1.B**).

Histologiquement, l'utérus de la souris se compose de l'endomètre et du myomètre. À l'intérieur des cornes, on trouve l'épithélium luminal, une couche de cellules épithéliales, suivi de l'épithélium

glandulaire, formé de glandes et de stroma, qui est lui-même constitué de cellules polyédriques et de tissu conjonctif. Le myomètre est formé de deux couches distinctes : une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe. Les cellules musculaires lisses du myomètre sont entourées de tissu conjonctif hautement vascularisé, facilitant la contraction et l'adaptation aux besoins de la gestation. Ainsi, l'utérus de la souris, bien que similaire à celui de la femme sur le plan histologique, se distingue par sa structure bicornue et son adaptation à la gestation multiple.<sup>13</sup> Contrairement à la femme, la souris ne présente pas de menstruations. Elle suit un cycle œstral divisé en quatre phases ; proœstrus, œstrus, métoœstrus et dioœstrus. La phase proœstrus, qui précède l'ovulation, est marquée par une augmentation des œstrogènes, un amincissement de l'épithélium et une dilatation de la lumière utérine. L'ovulation a lieu pendant l'œstrus, avec une forte activité glandulaire. Le métoœstrus correspond à une phase de transition hormonale accompagnée d'une diminution de l'épaisseur épithéliale. Le dioœstrus correspond à une période de repos, l'utérus devient plus petit et inactif, avec une activité glandulaire minimale. Si aucune gestation ne survient, le cycle recommence avec une nouvelle phase de proœstrus.

Ce cycle, bien que similaire au cycle menstruel humain en termes de régulation hormonale par l'axe hypothalamo-hypophysaire, se distingue par l'absence de desquamation. Il s'agit néanmoins d'un modèle pertinent pour l'étude des modifications histologiques et moléculaires de l'utérus, en particulier dans les pathologies œstrogéno-dépendantes comme l'adénomyose.<sup>14</sup> Il permet également d'évaluer l'efficacité de différentes approches thérapeutiques dans ce cadre expérimental contrôlé. Grâce à sa reproductibilité et à la possibilité de manipulations ciblées, le modèle murin offre un support utile pour tester des interventions avant leur transposition à la pratique clinique.



**Figure 1 : Anatomie comparée de l'appareil reproducteur féminin chez l'humain et la souris.**

(A) Chez l'humain, l'appareil reproducteur féminin comprend les ovaires, les trompes de Fallope, un utérus unique (composé du myomètre et de l'endomètre), le col de l'utérus (cervix) et le vagin.

(B) Chez la souris, on retrouve une organisation similaire avec des ovaires et un vagin, mais l'utérus est divisé en deux longues cornes utérines, adaptées au développement simultané de plusieurs embryons. Une coupe transversale met en évidence les couches internes de la paroi utérine.

### 3. Mécanismes physiopathologiques

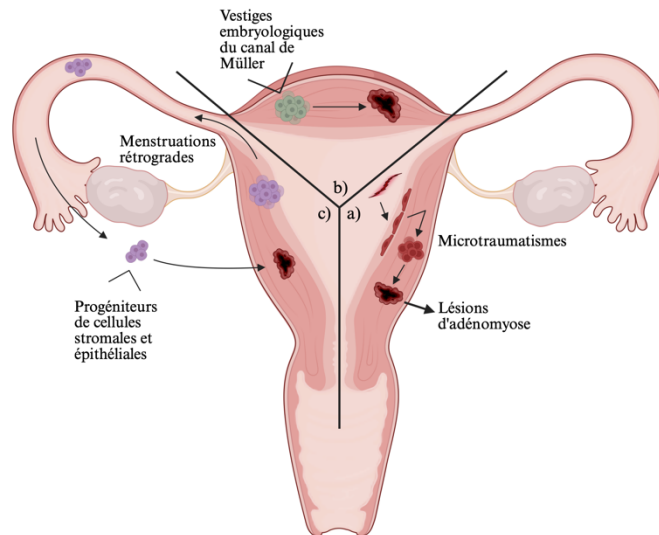
#### 3.1. Hypothèses étiopathogéniques

La présence anormale de tissu endométrial au sein du myomètre, associée à une réaction musculaire locale, constitue le noyau des altérations observées dans l'adénomyose. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les mécanismes à la base de cette désorganisation tissulaire. Bien que l'origine exacte de l'adénomyose reste incertaine, trois théories dominent : l'invagination du tissu endométrial, la métaplasie *de novo* et la migration de cellules souches (**Fig. 2**).

La théorie de l'invagination est actuellement la plus acceptée pour expliquer le développement de la pathologie. Elle repose sur l'hyperactivation du système de réparation tissulaire, TIAR (*tissue injury and repair*), en réponse à des microtraumatismes répétés au niveau de la zone de jonction (JZ). Ces lésions seraient favorisées par un état d'hyperœstrogénisme, souvent associé à des polymorphismes des gènes **CYP** et **COMT**, impliqués dans le métabolisme des œstrogènes.<sup>15</sup> Cette surproduction hormonale stimule excessivement la JZ, provoquant un hyperpéristaltisme utérin. Les contractions utérines, trop fréquentes et trop intenses, entraînent alors des microtraumatismes. En réponse, le système TIAR s'active, générant une inflammation et une production locale d'œstrogènes, qui viennent entretenir le cercle vicieux. L'œstradiol (E2) interagit avec les récepteurs **ER $\alpha$**  et **ER $\beta$**  : le premier stimule la production d'ocytocine, renforçant les contractions, tandis que le second est surexprimé au sein des lésions adénomyosiques en raison d'un excès d'E2, favorisant l'hyperprolifération cellulaire (**Fig. 3**).<sup>16,17</sup> Ce mécanisme d'auto-entretien contribue à l'aggravation progressive de la pathologie.

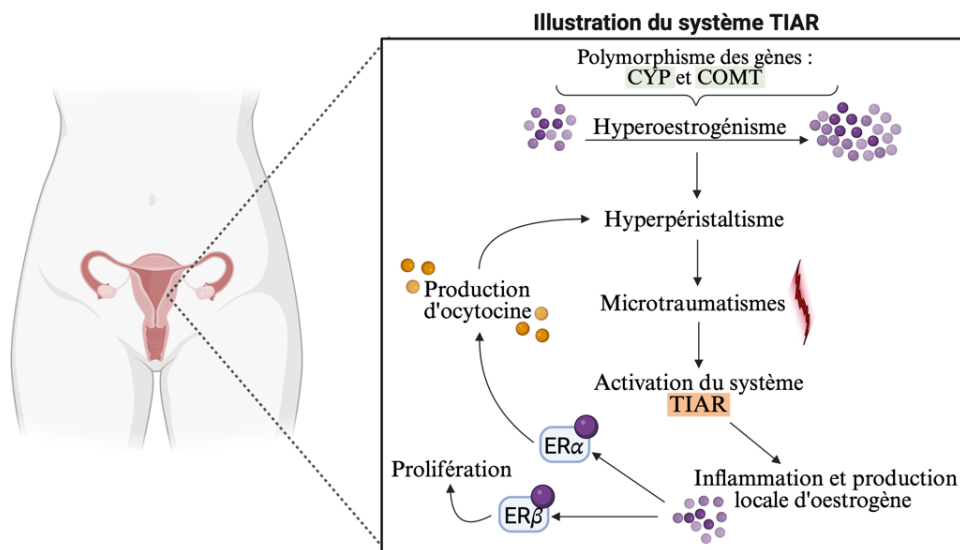
La seconde hypothèse évoque une origine cellulaire : soit à partir de cellules embryonnaires dérivées du canal de Müller, soit via la différenciation de cellules souches adultes. La couche basale de l'endomètre contient des progéniteurs de cellules souches endométriales, capables de régénérer le tissu.<sup>18</sup> Il a été suggéré que des vestiges embryologiques du canal de Müller persistent dans le myomètre et, sous l'effet de changements métaplastiques, se différencient en tissu endométrial, formant ainsi les lésions adénomyosiques.<sup>19</sup> De plus, certaines cellules souches adultes de la couche basale pourraient migrer vers le myomètre, où elles se différencieraient en glandes endométriales.<sup>20</sup> Des microtraumatismes de la JZ pourraient perturber les niches de cellules souches, favorisant leur implantation ectopique.<sup>21</sup>

Enfin, une hypothèse complémentaire repose sur la migration de cellules souches adultes de la couche basale de l'endomètre vers le myomètre, potentiellement via un mécanisme semblable à celui proposé pour l'endométriose (menstruation rétrograde). Cette théorie a été décrite par le docteur John Sampson en 1920.<sup>22</sup>



**Figure 2 : Hypothèse étiopathogéniques du développement de l'adénomyose.**

Illustration des trois hypothèses évoquées : activation du système TIAR suite à la présence de microtraumatismes (a), différenciation de vestiges embryologiques du canal de Müller (b), migration de cellules progénitrices de cellules stromales et épithéliales lors d'un processus de menstruations rétrograde (c). Adapté de *Zhai et al.*<sup>23</sup>



**Figure 3 : Illustration de l'activation du système TIAR dans l'adénomyose.**

Le schéma illustre les interactions entre hyperœstrogénisme, hyperpéristaltisme, microtraumatismes, menant à l'activation du système TIAR. Illustration du cercle vicieux suivant l'activation de ce système avec une production d'estrogène locale et de l'inflammation.

### 3.2. Lien avec l'endométriose :

L'adénomyose et l'endométriose sont deux pathologies gynécologiques caractérisées par la présence ectopique de tissu endométrial, mais leur localisation diffère. Dans l'endométriose, le tissu endométrial ectopique se situe en dehors de l'utérus, le plus souvent au niveau du péritoine, des ovaires ou des ligaments utérosacrés. En revanche, dans l'adénomyose, ce tissu infiltre le myomètre, la couche

musculaire interne de l'utérus, ce qui lui vaut parfois le nom d'« endométriose interne ».<sup>17</sup> Ces deux pathologies sont fréquemment concomitantes chez une même patiente et présentent de nombreuses similitudes cliniques : douleurs pelviennes chroniques, dysménorrhée, ménorragies, dyspareunie et infertilité. Pendant longtemps, elles ont été confondues, faute de moyens de diagnostic suffisamment précis pour les différencier. Certaines études suggèrent qu'elles pourraient partager des mécanismes physiopathologiques communs, tels qu'une angiogenèse accrue, une capacité de migration et d'invasion cellulaire, une hyperprolifération et des altérations du système immunitaire local, impliquant notamment les macrophages. Toutefois, cette vision n'est pas unanimement partagée. D'autres chercheurs considèrent que l'endométriose et l'adénomyose sont en réalité deux pathologies bien distinctes, tant par leurs origines que par leurs évolutions cliniques.<sup>24</sup> Ainsi, bien que présentant des points communs, l'adénomyose mérite une attention spécifique en raison de ses particularités histologiques, évolutives et thérapeutiques.

#### **4. Mécanismes de développement et de progression de la pathologie :**

L'adénomyose est une pathologie qui évolue au cours du temps, caractérisée par une progression des lésions dans le myomètre. Cette évolution est soutenue par plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires incluant la prolifération, la migration/invasion, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et l'inflammation chronique.

L'invasion du myomètre serait en partie favorisée par la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), un changement phénotypique permettant aux cellules épithéliales d'acquérir des propriétés mésenchymateuses. Ce phénomène s'accompagne d'une perte d'adhésion intercellulaire, notamment via la baisse de l'expression de l'E-cadhérine, et d'une augmentation de la plasticité et de la motilité, en lien avec la surexpression de la vimentine et la sécrétion de métalloprotéinases. Dans les lésions adénomyosiques, une diminution de l'E-cadhérine et une surexpression de la vimentine ont été observées, comparativement à l'endomètre sain, ce qui soutient l'hypothèse d'une EMT facilitant la migration des cellules endométriales vers le myomètre.<sup>25</sup>

Enfin, un déséquilibre du microenvironnement immunitaire contribue à la progression des lésions. Bien que présents physiologiquement dans l'endomètre, le nombre de macrophages est significativement augmenté chez les femmes atteintes d'adénomyose.<sup>26</sup> Une prédominance des macrophages M2 s'accompagne d'une production accrue de cytokines et de facteurs comme l'IL-10, le TGF- $\beta$  et le VEGF, ainsi que de métalloprotéinases (MMPs), tous impliqués dans le remodelage tissulaire. Si ces éléments sont bénéfiques en contexte physiologique, leur excès favorise ici la fibrose, l'angiogenèse et l'invasion cellulaire. De plus, les macrophages M2 activent des voies de signalisation telles que TGF- $\beta$ 1/Smad3 et IL-6/JAK2/STAT3, stimulant la prolifération cellulaire dans les lésions et contribuant à l'aggravation de la maladie.<sup>27</sup>

## **5. Diagnostic**

A l'heure actuelle, il est encore difficile de diagnostiquer l'adénomyose d'un point de vue purement technique. Il y a encore quelques années, le seul moyen était d'effectuer un test histologique après hystérectomie. Cette opération n'étant réalisée que sur des femmes âgées ou bien lorsque les symptômes affectaient excessivement la qualité de vie, cela exclut un très grand nombre de cas pour lesquels un diagnostic final ne pouvait être réalisé. Les technologies modernes, comme l'imagerie par ultrasons par voie transvaginale (TVS) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM), permettent de mieux caractériser l'adénomyose et de la différencier d'autres pathologies utérines. Par exemple, le TVS permet de distinguer l'adénomyose des léiomyomes en observant les vaisseaux sanguins : diffus dans l'adénomyose et circulaires dans les léiomyomes. Cette technique permet aussi de différencier l'adénomyose locale, avec des lésions limitées, de l'adénomyose diffuse, plus fréquente, où les lésions se propagent dans le myomètre.<sup>28</sup> L'IRM est également sensible, mais légèrement plus spécifique, et permet de visualiser la localisation et la taille des lésions ainsi que la présence de pathologies concomitantes.<sup>29</sup> Le choix entre ces deux techniques dépend des caractéristiques de la patiente et de la disponibilité des équipements.

## **6. Approches thérapeutiques actuelles**

A l'heure actuelle, il n'y a pas de traitements curatifs disponibles pour l'adénomyose, toutefois, il existe plusieurs façons d'en soulager les symptômes et d'améliorer la qualité de vie des patientes. Ces stratégies incluent des traitements médicamenteux (hormonaux ou non), radiologiques ou des interventions chirurgicales.

### **6.1. Traitements hormonaux**

Parmi les options hormonales, les progestatifs jouent un rôle central en raison de leurs effets antiprolifératifs et anti-inflammatoires. Toutefois, dans l'adénomyose, leur efficacité est parfois limitée par une résistance à la progestérone. Le système intra-utérin au lévonorgestrel (SIU) a montré de bons résultats dans les formes légères de la maladie en diminuant l'expression des récepteurs aux œstrogènes et en induisant l'atrophie de l'endomètre ectopique.<sup>30</sup> Il diminue significativement les saignements menstruels anormaux et améliore la qualité de vie des patientes. Toutefois, son efficacité diminue lorsque le volume utérin dépasse 150ml, comme l'a démontré une étude coréenne.<sup>31</sup> Le Diénogest, un progestatif à haute affinité pour les récepteurs à la progestérone, est bien toléré et peut être administré à long terme.<sup>32</sup> Les contraceptifs oraux combinés (COCs) induisent un état de pseudo-gestation, conduisant à la décidualisation et à l'atrophie de l'endomètre ainsi que des lésions adénomyosiques. Ceux-ci ont également un effet bénéfique, quoique d'une efficacité moindre par rapport au SIU.<sup>33</sup> Enfin, les analogues de la GnRH (« Gonadotropin-release hormone »), agonistes ou antagonistes, représentent une option de deuxième ligne lorsque les traitements à base de progestatifs ne sont ni efficaces ni bien

tolérés par les patientes. Les agonistes de la GnRH provoquent une suppression prolongée de l'axe hypothalamo-hypophysaire et une hypoestrogénie, tandis que les antagonistes bloquent rapidement la liaison de la GnRH à ses récepteurs hypophysaires, conduisant à une chute immédiate des gonadotrophines.<sup>34</sup>

Malgré leur efficacité sur la réduction de la douleur et du volume utérin, ces analogues présentent plusieurs limites. Tout d'abord, les modifications hormonales qu'ils induisent peuvent provoquer des effets secondaires, tels que des bouffées de chaleur, une sécheresse vaginale et une baisse de densité osseuse, pouvant à terme favoriser l'ostéoporose. Par ailleurs, ces traitements ont un impact direct sur la fertilité. Si les agonistes de la GnRH peuvent être pris de manière continue pendant une grossesse, ils nécessitent souvent d'être associés à une technique de procréation médicalement assistée (PMA). À l'inverse, certains traitements, comme les COCs, doivent être arrêtés en cas de désir de grossesse, car ils bloquent l'ovulation. Enfin, l'une des principales limites des traitements hormonaux réside dans leur efficacité transitoire. Dès l'arrêt du traitement, les symptômes réapparaissent et le volume utérin tend à augmenter à nouveau, impliquant une prise prolongée du traitement pour maintenir ses effets, ce qui peut poser des problèmes de tolérance et accroître le risque d'effets secondaires.<sup>35</sup>

## **6.2. Traitements non hormonaux**

Face aux limites des traitements hormonaux, notamment leur efficacité temporaire, leurs effets indésirables et leur impact sur la fertilité, des alternatives non hormonales peuvent être envisagées, notamment la prise en charge symptomatique.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont les plus couramment utilisés dans cette optique. Ils ont la capacité de bloquer l'activité de l'enzyme cyclooxygénase (COX), provoquant l'inhibition de la production d'un ensemble de molécules impliquées dans la cascade inflammatoire, telles que les prostaglandines et les thromboxanes. Ils sont utilisés afin de réduire certains symptômes comme les douleurs pelviennes et les dysménorrhées. Toutefois, une proportion significative de patientes (environ 20 %) ne répond pas à ce traitement.<sup>36</sup>

## **6.3. Traitements radiologiques :**

Lorsque le traitement médicamenteux s'avère inefficace, il est possible d'avoir recours à un traitement radiologique. Deux options sont alors envisageables : l'embolisation des artères utérines (UAE) et les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU). Ces deux techniques ont démontré leur efficacité, en particulier sur les léiomyomes utérins, ce qui a conduit les chercheurs à les étudier dans le cadre de l'adénomyose. L'UAE consiste à obstruer les artères utérines au moyen d'un cathéter introduisant des microparticules biocompatibles afin de bloquer ces vaisseaux. La privation d'apport sanguin entraîne alors la réduction ou la destruction des zones ciblées. Les résultats sont globalement positifs, avec une diminution de la taille de l'utérus ainsi qu'un allègement des symptômes liés à la pathologie. Toutefois,

cette méthode engendre des douleurs post-opératoires qui nécessitent une prise en charge spécifique.<sup>37</sup> Bien que l'efficacité soit avérée à court terme, le taux de récurrence est élevé dans les deux années suivant le traitement.<sup>38</sup> Quant aux ultrasons focalisés de haute intensité, il s'agit d'une méthode d'ablation thermique locale non invasive, permettant d'entraîner une aménorrhée et de réduire l'inflammation. Cette approche innovante constitue une alternative intéressante à la chirurgie, souvent considérée comme une intervention lourde.<sup>39</sup> Néanmoins, son efficacité, son rapport bénéfice-coût ainsi que ses effets indésirables doivent encore faire l'objet d'études approfondies.

#### **6.4. Traitements chirurgicaux**

L'hystérectomie reste la seule option curative définitive mais est incompatible avec un désir de grossesse. Des alternatives conservatrices comme l'adényomyectomie, une technique chirurgicale qui consiste à retirer uniquement le tissu malade présent dans le myomètre, existent. Toutefois, cette technique est réservée aux formes locales bien délimitées et reste une technique complexe à réaliser. Les interventions chirurgicales sont envisagées pour les patientes qui ne répondent pas aux autres approches thérapeutiques.<sup>40</sup>

#### **6.5. Limites des traitements existants**

Malgré la diversité des approches disponibles, les traitements actuels présentent des limites importantes et ne permettent pas une guérison complète. Les options médicamenteuses, hormonales ou non, sont souvent associées à une efficacité transitoire et comportent des effets secondaires contraignants. Les techniques radiologiques et interventions chirurgicales sont réservées aux formes plus sévères de la maladie. Ce sont des options invasives, souvent inconfortables pour la patiente et qui compromettent la fertilité. Ces constats soulignent la nécessité de développer de nouvelles thérapies dans le traitement de l'adényomyose, mieux ciblées et idéalement compatibles avec un désir de grossesse. Dans ce contexte, la voie du S1P suscite un intérêt croissant.

### **7. La voie du S1P :**

Une voie métabolique qui suscite un intérêt croissant dans le contexte de l'endométriose, puis de l'adényomyose, est celle de la sphingosine-1-phosphate (S1P). Cet engouement s'explique par la découverte du rôle central de cette voie dans la régulation de divers processus biologiques clés, tels que l'invasion cellulaire, la prolifération, l'angiogenèse et la modulation de la réponse immunitaire, autant de mécanismes impliqués dans la physiopathologie de ces deux maladies.<sup>41</sup> Ces observations ont conduit au développement de recherches visant à cibler la voie du S1P dans le but de freiner la progression de la maladie et d'en atténuer les manifestations cliniques.

## 7.1. Intérêt de la voie du S1P dans les pathologies utérines

Le sphingosine-1-phosphate (S1P) est le sphingolipide bioactif au centre de la voie du S1P. Bien que cette voie de signalisation ait été initialement étudiée dans le contexte de l'endométriose, son implication dans la physiopathologie de l'adénomyose suscite aujourd'hui un intérêt croissant. En effet, plusieurs altérations des niveaux de S1P, de ses enzymes régulatrices et de ses récepteurs ont été observées dans des modèles expérimentaux et des tissus humains de lésions adénomyosiques. L'intérêt initial de cette voie dans les pathologies gynécologiques s'est concentré sur l'endométriose, en raison de la résistance accrue à l'apoptose observée dans les lésions et de l'implication potentielle du S1P dans l'inflammation chronique, la vascularisation et la survie cellulaire. Ces observations ont conduit à explorer des voies métaboliques alternatives à celle du céramide, notamment l'hyperactivation de SPHK1 et l'accumulation de S1P dans les lésions endométriotiques.<sup>42</sup>

Compte tenu des similitudes physiopathologiques entre l'endométriose et l'adénomyose, en particulier en termes de fibrose, d'angiogenèse et de dérégulation immunitaire, la voie du S1P a été étudiée dans des échantillons utérins humains, provenant de femmes atteintes de l'adénomyose. Les premières données disponibles suggèrent une régulation altérée de cette voie, notamment une augmentation de l'expression de SPHK1 et de certains récepteurs S1PRs, ainsi qu'une diminution des enzymes de dégradation du S1P.<sup>43</sup>

Dans ce contexte, le S1P apparaît comme une cible thérapeutique prometteuse, en particulier dans une perspective de traitement non hormonal, compatible avec un projet de fertilité.

## 7.2. Métabolisme du sphingosine-1-phosphate

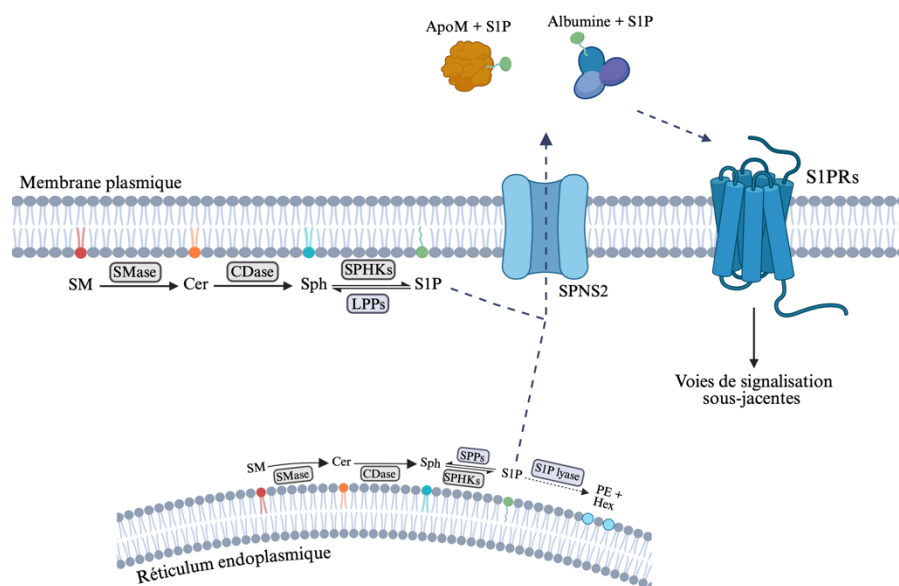
### 7.2.1. Production du sphingosine-1-phosphate

Le sphingosine-1-phosphate (S1P) est un sphingolipide bioactif dérivé de la sphingosine, un alcool insaturé à longue chaîne qui constitue le squelette de base des sphingolipides, tels que les glycosphingolipides et les sphingomyélines, composants majeurs de la membrane cytoplasmique. La production du S1P suit plusieurs étapes (**Fig. 4**). Tout d'abord, les glycosphingolipides et les sphingomyélines sont dégradés en céramide, un sphingolipide essentiel pour la barrière protectrice de la peau. Ensuite, les céramides sont hydrolysés en sphingosine par l'action de la céramidase. Enfin, la sphingosine est phosphorylée en S1P grâce à l'action de deux enzymes spécifiques, les sphingosine-kinases (SPHK1 et SPHK2).<sup>44</sup> Ces deux kinases ont des localisations et des fonctions distinctes. SPHK1 est principalement située dans le cytosol, où elle produit du S1P qui peut soit être dégradé, soit être exporté vers le milieu extracellulaire pour exercer ses effets biologiques via la liaison à des récepteurs spécifiques (S1PRs). En revanche, SPHK2 est localisée dans le noyau, où elle semble être associée à un complexe de répression comprenant HDAC1/2. Ce complexe est lié aux promoteurs de gènes comme p21, un inhibiteur des kinases cycline-dépendantes, et c-Fos, un facteur régulateur de transcription. Une fois la sphingosine phosphorylée en S1P par SPHK2 dans le noyau, le S1P nucléaire

inhibe HDAC1/2, favorisant ainsi la transcription de c-Fos et p21. Ainsi, le S1P produit dans le noyau joue un rôle clé dans la régulation de l'apoptose, tandis que celui produit dans le cytosol et exporté vers l'extérieur de la cellule intervient dans des processus comme la prolifération, l'infiltration immunitaire et l'angiogénèse.

### 7.2.2. Dégradation du sphingosine-1-phosphate :

Une fois produit dans le cytosol, le S1P peut soit être dégradé, soit être exporté vers le milieu extracellulaire. La dégradation du S1P peut elle-même suivre deux voies distinctes : l'une est réversible et l'autre est irréversible. La voie réversible permet la reconversion du S1P en sphingosine. Ce processus est catalysé par deux types d'enzymes ; les lipides phosphate phosphatases (LPPs), enzymes membranaires peu spécifiques, et les sphingosine-1-phosphate phosphatases (SPPs), qui agissent spécifiquement sur le S1P.<sup>45</sup> Les SPPs déphosphorylent le S1P dans les compartiments intracellulaires et en particulier dans le réticulum endoplasmique et régulent finement les niveaux intracellulaires de S1P. Deux isoformes de ces enzymes, SPP1 et SPP2, ont été identifiées chez les mammifères.<sup>46</sup> La deuxième voie est une dégradation irréversible, catalysée par la S1P lyase, également localisée dans le réticulum endoplasmique. Cette enzyme clive le S1P en phosphoéthanolamine et hexadécénal, deux molécules qui serviront ensuite de substrats dans la voie de synthèse des glycérolipides.<sup>47</sup> Lorsqu'il n'est pas dégradé, la majorité du S1P est exportée vers le milieu extracellulaire grâce au transporteur spinster homologue 2 (SPNS2). Toutefois, des études ont montré que SPNS2 n'est pas le seul transporteur impliqué, car même en l'absence de ce gène, du S1P est néanmoins détecté dans le milieu extracellulaire. Cela suggère l'existence d'autres transporteurs membranaires encore à identifier.<sup>48</sup>



#### Figure 4. Représentation schématique du métabolisme du S1P.

Illustration des voies de synthèse à partir de la sphingomyéline (SM), hydrolysée en céramide (Cer) par la sphingomyélinase (SMase). Le céramide est ensuite dégradé en sphingosine (Sph) par la céramidase (CDase), puis phosphorylé par les sphingosine kinases 1 ou 2 (SPHKs), générant le sphingosine-1-phosphate (S1P). Le S1P peut être dégradé soit par les lipides phosphate phosphatases (LPPs) à la membrane plasmique, soit par les sphingosine-1-phosphate phosphatases (SPPs) au niveau du réticulum endoplasmique. Dans ce compartiment, le S1P peut également être clivé en phosphoéthanolamine et hexadécénal (PE + Hex) par la S1P lyase. Une fois dans le cytosol, le S1P peut être exporté vers le milieu extracellulaire via le transporteur Spinster homologue 2 (SPNS2). Il est ensuite transporté dans la circulation lié à l'apolipoprotéine M du HDL (ApoM) ou à l'albumine, et exerce ses effets par l'intermédiaire de ses récepteurs (S1PRs), présents à la surface de différents types cellulaires. Adapté de *Hu et Dai*.<sup>49</sup>

### 7.3. Rôle physiologique du sphingosine-1-phosphate :

Le sphingosine-1-phosphate (S1P) est un sphingolipide bioactif qui joue un rôle fondamental dans plusieurs processus physiologiques. L'un des éléments clés de son mode d'action repose sur la création d'un gradient de concentration, servant de signal pour diverses cellules, notamment immunitaires. Pour maintenir ce gradient, les niveaux de S1P restent très bas dans les tissus grâce à l'action de la S1P lyase et des phosphatases, il est cependant présent en plus grande quantité dans le sang et la lymphe. Dans la circulation sanguine, il est majoritairement lié à des protéines chaperonnes, principalement l'apolipoprotéine ApoM du HDL, mais aussi, dans une moindre mesure, à l'albumine. Ces protéines assurent son transport, limitent sa dégradation et facilitent son interaction avec ses récepteurs cellulaires.<sup>50</sup> Dans la lymphe, bien que sa concentration soit plus faible que dans le sang, elle reste suffisante pour maintenir un gradient avec les tissus environnants, grâce à la présence d'enzymes capables de le dégrader, comme la lipide phosphate phosphatase 3.<sup>51</sup> L'action du S1P repose essentiellement sur son interaction avec ses cinq récepteurs spécifiques, S1PR1 à S1PR5, appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ces récepteurs sont impliqués dans des fonctions diverses selon leur localisation. Les récepteurs S1PR1, S1PR2 et S1PR3 sont majoritairement exprimés dans les cellules endothéliales, où ils jouent un rôle clé dans le développement et l'homéostasie du système vasculaire.<sup>52</sup> S1PR1, présent également sur les cellules immunitaires, est crucial pour la migration des lymphocytes T et des macrophages dans le sang et la lymphe.<sup>53</sup> Le S1PR4, principalement exprimé dans les cellules immunitaires, semble être impliqué dans certaines maladies inflammatoires et auto-immunes.<sup>54</sup> Enfin, le S1PR5 est retrouvé principalement dans le système nerveux central, où il intervient notamment dans la physiopathologie de la sclérose en plaques.<sup>55</sup>

D'un point de vue physiologique, le S1P est indispensable au bon développement de plusieurs systèmes vitaux. Son importance a été démontrée par *Mizugishi et al.*, qui ont observé que des embryons dépourvus des enzymes Sphk1 et Sphk2 (responsables de sa synthèse) meurent in utero avant le 13,5<sup>e</sup> jour de développement embryonnaire, en raison d'anomalies vasculaires et neurologiques.<sup>56</sup> Au-delà du développement embryonnaire, le S1P joue un rôle essentiel tout au long de la vie, notamment dans l'homéostasie vasculaire. Via les récepteurs S1PR1, S1PR2 et S1PR3, il module des processus tels que

l'angiogénèse, la stabilité de la barrière endothéliale et la régulation de la vasoconstriction et de la vasodilatation.<sup>57</sup> Il agit également directement sur le muscle cardiaque, influençant sa contractilité et renforçant ainsi son rôle clé dans la régulation vasculaire.<sup>58</sup> Par ailleurs, l'expression des récepteurs S1PR dans certaines cellules immunitaires lui confère un rôle immunomodulateur. De plus, le S1P intervient dans la survie des cellules reproductrices masculines et féminines. Chez la femme, il prévient l'apoptose des ovocytes causée par la chimiothérapie, bien que son mécanisme d'action exact reste à déterminer.<sup>59</sup>

Ce rôle fondamental du S1P dans la régulation de fonctions biologiques majeures soulève l'hypothèse qu'une altération de cette voie pourrait contribuer à certains processus pathologiques, comme ceux observés dans l'adénomyose.

#### **7.4. La possible implication de la voie du S1P dans l'adénomyose :**

Les chercheurs se sont d'abord intéressés au rôle du S1P dans la pathologie de l'endométriose après avoir constaté une résistance accrue à l'apoptose dans les cellules endométriotiques, ce qui laisse supposer une altération de la voie du céramide.<sup>42</sup> L'hypothèse qui a été avancée est qu'une conversion excessive de la sphingosine en S1P pourrait être à l'origine de cette résistance. Une étude portant sur la modulation des acteurs clés de la voie du S1P dans l'endométriose a révélé une diminution de l'expression des gènes codant pour SGPP2 et SGPL, deux enzymes responsables de l'inactivation du S1P. Cette réduction entraînerait une accumulation de S1P dans les tissus endométriotiques. En revanche, aucune variation significative de l'expression de SPHK1 et SPHK2 n'a été observée.<sup>60</sup> Une autre étude a également montré que la concentration en S1P était significativement plus élevée dans les lésions d'endométriose que dans les tissus sains adjacents.<sup>61</sup>

Ces découvertes, ainsi que la concomitance entre l'endométriose et l'adénomyose, ont incité les chercheurs à étudier la voie du S1P dans l'adénomyose. Une seule étude, à ce jour, a été menée sur la modulation de la voie du S1P dans les lésions adénomyosiques. Ses résultats suggèrent des altérations similaires à celles observées dans l'endométriose, notamment une diminution de l'expression des enzymes de dégradation du S1P, en particulier SGPP2. Cependant, si dans l'endométriose, une modulation du facteur activateur SPHKAP avait été observée, l'adénomyose se distingue par une augmentation de l'expression de CIB1, un autre cofacteur d'activation de SPHK1. Ce phénomène favoriserait l'activation et la translocation de SPHK1, entraînant ainsi une augmentation de la production de S1P. Par ailleurs, l'expression des récepteurs du S1P semble également modulée dans les lésions adénomyosiques, avec une surexpression de S1PR3, S1PR4 et S1PR5, et une réduction de S1PR2.<sup>43</sup> Ces études suggèrent qu'une augmentation du S1P et une modulation de l'expression de ses récepteurs sont potentiellement impliqués dans la physiopathologie de l'endométriose mais aussi de l'adénomyose.

### 7.5. Les potentiels mécanismes pathologiques activés par le S1P :

Le S1P, en interagissant avec des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules, active diverses cascades de signalisation susceptibles de contribuer à la physiopathologie de l'adénomyose. Parmi les mécanismes les plus importants figurent : la migration des cellules immunitaires, la fibrose, l'angiogenèse, ainsi que la migration et la survie cellulaire. Ces processus sont particulièrement pertinents dans le contexte de l'adénomyose, souvent associée à une inflammation chronique, une fibrose exacerbée et un remodelage tissulaire anormal. Le S1P agit comme un puissant signal chimiotactique, notamment via les récepteurs S1PR1 exprimés sur les macrophages et les lymphocytes T. Ces cellules sont attirées vers les sites où la concentration en S1P est plus élevée, notamment au niveau des lésions, contribuant ainsi à l'installation d'un microenvironnement inflammatoire.<sup>62</sup> Une fois sur place, les cellules immunitaires libèrent diverses cytokines, telles que des interleukines, mais aussi du TNF- $\alpha$  et du TGF- $\beta$ , qui jouent un rôle clé dans le maintien de l'inflammation chronique. Le TGF- $\beta$  pourrait activer la voie Smad2/3 et ainsi initier le processus de fibrose. Par ailleurs, il a été démontré que certains récepteurs du S1P, après avoir interagi avec leur ligand, peuvent également phosphoryler Smad2/3 indépendamment de la présence de TGF- $\beta$ , déclenchant ainsi une cascade responsable de la fibrose.<sup>63,64</sup>

Le S1P intervient également dans l'angiogenèse, processus bien documenté dans les lésions adénomyosiques.<sup>65</sup> En se liant aux récepteurs de type 1 et 3 des cellules endothéliales, il induit l'expression de l'angiopoïétine1 (Ang1) favorisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.<sup>66</sup> Ce remodelage vasculaire pourrait faciliter l'apport de nutriments et le maintien des foyers ectopiques.

En outre, le S1P influence également la migration cellulaire en activant, via S1PR1 et S1PR3, la GTPase Rho, qui régule la polymérisation de l'actine. Cette signalisation induit la formation de fibres de stress qui génèrent une tension mécanique nécessaire à la migration cellulaire. Cette action favorise aussi le regroupement des intégrines, qui forment des contacts focaux essentiels au déplacement des cellules en permettant leur ancrage à la matrice extracellulaire.<sup>67</sup>

Enfin, en ce qui concerne la survie cellulaire, il semblerait que le S1P inhibe l'apoptose et favorise la survie des cellules. Pour ce faire, en interagissant avec ses récepteurs, le S1P active une cascade de signalisation impliquant Ras, Raf et MEK1/2, ce qui conduit à la phosphorylation et à l'activation de la kinase ERK1/2. Cette kinase joue un rôle clé dans la survie cellulaire en inhibant les protéines pro-apoptotiques et en activant les voies de survie.<sup>68</sup>

Ainsi, le S1P apparaît comme un médiateur central, capable d'influencer simultanément plusieurs aspects de la physiopathologie de l'adénomyose, notamment l'inflammation, la fibrose, l'angiogenèse et le comportement migratoire et apoptotique des cellules impliquées dans les lésions.

## 7.6. Ciblage thérapeutique de la voie du S1P :

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons concentré nos recherches sur deux inhibiteurs particuliers agissant à différents niveaux de la voie du S1P : le SKI-5C et le Fingolimod. Le Fingolimod, également appelé FTY720, est un immunosuppresseur déjà approuvé pour le traitement de la sclérose en plaques. Sa structure est similaire à celle de la sphingosine, ce qui lui permet d'être phosphorylé principalement par la kinase SPHK2 pour devenir FTY720-p.<sup>69</sup> Sous cette forme, FTY720-p est un agoniste de plusieurs récepteurs du S1P (S1PR1-3-4 et 5) et en même temps un antagoniste fonctionnel du récepteur S1PR1. Le Fingolimod se lie à ce dernier récepteur, présent à la surface des cellules immunitaires, et provoque son internalisation. Cela empêche les lymphocytes d'exprimer ce récepteur et de migrer selon le gradient de S1P. En conséquence, les cellules immunitaires sont séquestrées dans les organes lymphoïdes secondaires et ne peuvent plus atteindre le site lésionnel, ce qui entraîne une réduction de l'inflammation.<sup>69</sup> Une étude réalisée sur l'endométriose a démontré que l'utilisation de FTY720 sur des souris inhibe la croissance et la fibrose des lésions, cependant cette étude a aussi observé l'apparition d'une lymphopénie due au FTY720 ce qui pourrait entraîner des complications.<sup>70</sup>

Le SKI-5C, quant à lui, est un inhibiteur de la kinase SPHK1. Son action consiste à réduire directement la production de S1P en inhibant cette kinase. Bien que le SKI-5C n'ait pas encore été suffisamment étudié pour en connaître tous les effets, notamment sur la pathologie de l'adénomyose, une étude parue en 2021 a examiné ses effets sur les lésions d'endométriose. Les résultats ont montré qu'il inhibe la vascularisation et le développement des lésions, des résultats prometteurs qui soulignent l'importance de poursuivre les recherches sur cet inhibiteur.<sup>71</sup>

---

---

# **Matériels et méthodes**

---

---

---

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

---

## MANIPULATIONS *IN VIVO* :

### 1. Modèle murin :

Pour effectuer nos expériences, nous avons travaillé sur un modèle de souris approuvé par le comité d'éthique de l'université de Liège (#2387 et #2590). Les souris utilisées étaient des souris CD1 nées de souris gestantes provenant du laboratoire Charles River (Italie), gardées au nombre de 3 à 4 par cage à une température constante de  $\pm 21$  °C. Elles bénéficiaient d'un cycle jour/nuit de 12 heures et avaient à disposition de la nourriture et de l'eau en quantité illimitée.

#### 1.1. Induction de l'adénomyose :

Le jour suivant la naissance des souriceaux, ceux-ci sont répartis en deux groupes, un groupe expérimental (ADM), recevant du tamoxifène pour induire la pathologie, et un groupe contrôle (CTL), recevant uniquement le véhicule. Pendant 4 jours consécutifs, les animaux du groupe ADM recevaient une dose quotidienne de 1 mg/kg de tamoxifène (Sigma, T5648) par gavage à l'aide d'une microsonde (5µl/g de solution par gavage) (**Figure 5**). En parallèle, les animaux du groupe contrôle recevaient, par la même voie, un mix d'huile d'arachide, de lécithine et de lait concentré (2:0.2 :3, v/v), servant de véhicule au tamoxifène. Une fois le protocole d'induction terminé, les souriceaux étaient laissés en observation pour permettre le développement de la maladie durant 3 semaines dans le cas du modèle d'intervention précoce et durant 6 semaines dans le cas du modèle thérapeutique avant de démarrer les traitements (voir ci-après).

#### 1.2. Traitements avec les inhibiteurs :

Dans ce modèle expérimental, des souris ont été traitées avec deux inhibiteurs différents de la voie du S1P : du SKI-5C et du FTY720. Le SKI-5C (Cat#HY-117563 medchemexpress) et le FTY720 (Cat#HY-12005 medchemexpress) ont été donnés par injection intrapéritonéale à la dose de 10 mg/kg et 5 mg/kg respectivement, une fois par jour pendant 3 semaines. Un groupe témoin, nommé ADM, a reçu uniquement le véhicule des inhibiteurs, l'huile de maïs avec 5% de méthyl acétate et de l'huile de maïs avec 5% de DMSO respectivement pour le contrôle du SKI-5C et du FTY720, selon le même schéma d'injection que les groupes traités.

Le protocole expérimental comporte deux approches distinctes : un modèle d'intervention précoce et un modèle d'intervention tardif.

Dans le modèle d'intervention précoce, les souris, âgées de 6 semaines au moment du sacrifice, ont été traitées après gavage au tamoxifène (N=16) ou au véhicule (N=8). Seul l'inhibiteur FTY720 était administré dans ce modèle. Une corne de l'utérus était destinée à l'immunohistochimie et l'autre corne à une extraction d'ARN en vue d'effectuer des RT-qPCR. Pour les souris du modèle d'intervention

tardif, les souris ont été traitées lorsqu'elles étaient âgées de 6 semaines. Les expériences ont été réalisées en deux séries. Une première avec 5 souris ADM, 5 souris ADM + SKI-5C et 6 souris ADM + FTY720. Après sacrifice, 3 semaines post-traitement, une corne utérine de chaque souris a été utilisée pour faire des IHC et l'autre corne pour en extraire l'ARN. Pour la seconde série 7 souris ont été incluses dans chaque groupe. Nous avons ajouté un groupe contrôle recevant uniquement le véhicule du tamoxifène. Après sacrifice, une corne et une demi de chaque utérus a été utilisée afin de réaliser des FACS (data non illustrées dans ce mémoire). Tandis que l'autre demi-corne a été partagée entre la préparation pour l'IHC et l'extraction d'ARN.

Les échantillons destinés à l'IHC ont été fixés dans une solution de 4% de formol afin de préserver l'intégrité du tissu. Tandis que ceux destinés à la RT-qPCR ont été plongés dans l'azote avant d'être conservés à -80°C.

## **2. Immunofluorescence :**

Les échantillons d'utérus de souris ont été inclus en paraffine avant d'être coupés en fines tranches de 5 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome (Leica RM2125RT, Wetzlar, Allemagne) pour être ensuite déposés sur lame. Dans un premier temps, les lames sont placées dans un four à 60°C pendant toute la nuit afin de bien fixer le tissu à la lame. Les lames sont ensuite déparaffinées dans un bain de xylène avant d'être réhydratées progressivement dans différents bain d'éthanol à concentration décroissante allant de 100% à 70%, avant d'être plongées dans de l'eau distillée. L'étape suivante consiste à plonger les lames dans du tampon Target (1/10 dans AD) et de démasquer les sites antigéniques en utilisant un autoclave (126°C à 1,4 bar). Après avoir laissé refroidir les lames pendant une vingtaine de minutes, les peroxydases endogènes sont bloquées. Cette étape est importante puisque nous allons ultérieurement utiliser un système de révélation nécessitant les peroxydases. Pour ce faire, nous plongeons les lames dans une solution de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, 1/10 dans AD ; Carl ROTH 22029501, Karlsruhe, Allemagne) pendant 20 minutes. Par la suite, afin d'éviter le bruit de fond, nous allons bloquer les sites antigéniques aspécifiques avec une solution de blocage prête à l'emploi (1/5 dans AD ; Cell Signaling 15019L, Danvers, Etats-Unis), nous laissons les lames dans cette solution pendant 20 minutes à RT. Nous pouvons ensuite procéder au marquage avec les anticorps primaires. Dans le cadre de nos recherches, nous voulons observer l'endomètre et le myomètre. Comme anticorps primaires, nous avons utilisé l'anticorps Rabbit anti-EpCAM (Cell Signaling, 93790) qui permet de marquer les cellules épithéliales et l'anticorps Mouse anti- $\alpha$ SMA/FITC (Sigma, F3777) qui permet de marquer les cellules musculaires lisses du myomètre. Les anticorps primaires ont été dilués à 1/400 dans Dako Diluent (Dako S2022) et incubés pendant 1 heure à RT, à partir de cette étape nous travaillons dans le noir afin de préserver la sensibilité des fluorochromes utilisés. Après 1h d'incubation, nous effectuons 3 lavages de 5 minutes au PBS afin de se débarrasser des anticorps primaires non couplés. L'anticorps Mouse anti- $\alpha$ SMA/FITC est déjà couplé à un fluorochrome FITC et ne nécessite donc pas d'anticorps secondaire. En revanche pour l'anticorps Rabbit anti-EpCAM, nous avons utilisé un anticorps secondaire Mouse

anti-rabbit ENVISION/HRP (Dako K4003) ready-to-use que l'on incube pendant 30 minutes à RT. Nous procédons de nouveau à 3 lavages de 5 minutes au PBS. Enfin, nous utilisons le kit de tyramine fluorescéine (PerkinElmer) pour amplifier le signal fluorescent, les lames sont incubées avec du TSA-Cy3 dilué 1/2000 dans du « Amplifier diluent » pendant 10 minutes à température ambiante. Après une dernière étape de lavage de 3 fois 5 minutes au PBS, les lames sont montées avec du milieu de montage DAPI Fluoromount-G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA). La lecture a été effectuée par le scanner SLIDEVIEW VS2000 (Olympus, Anvers, Belgium) équipé d'un objectif UPlan-XApo 20× 0.8 NA (Olympus). Nous obtenons des coupes d'utérus dont le myomètre est marqué en vert et les cellules épithéliales constituant l'endomètre eutopique et ectopique, en rouge.

### **2.1. Quantification :**

L'expression de EpCAM et de  $\alpha$ SMA a été quantifiée à l'aide de l'analyse d'imagerie sous MATLAB R2021b. Les images ont d'abord été analysées en pleine couleur ainsi que selon leurs composantes rouge, verte et bleue. Les régions marquées par EpCAM apparaissaient en rouge, celles marquées par  $\alpha$ SMA en vert, et les noyaux marqués par le DAPI en bleu. La frontière entre le myomètre et l'endomètre a été délimitée manuellement afin de restreindre l'analyse quantitative au myomètre. Les différentes quantifications ont été réalisées à l'aide d'un logiciel développé au sein de notre laboratoire, basé sur le langage MATLAB. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du test de Kolmogorov-Smirnov. Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative.

### **3. Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne :**

Sur les tissus issus d'utérus des souris traitées ou non, nous avons effectué des analyses RT-qPCR afin d'étudier différents gènes impliqués dans les voies de l'inflammation, de la migration, de la survie ainsi que de la fibrose. Cette technique va nous permettre de comparer les niveaux d'expression des ARN messagers de ces différentes voies activées dans la pathologie de l'adénomyose entre les différents groupes.

#### **3.1. Extraction des ARNs:**

L'extraction des ARNm à partir de tissus prélevés sur les souris est effectuée à l'aide du kit RNeasy Mini Kit for tissues (Qiagen ; cat. nos. 74104). Dans un premier temps, nous préparons le buffer RLT en y ajoutant 10  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoéthanol pour chaque ml de buffer RLT. Nous plaçons un morceau de tissu de 30 mg maximum dans un tube contenant des billes et 600  $\mu$ l de buffer RLT, nous centrifugeons les tubes à vitesse maximale dans l'homogénéisateur de tissu Precellys® Evolution Touch (Bertin Technologies) pendant 30 secondes. Une fois le temps écoulé, nous vérifions que le tissu a bien été broyé avant de procéder à la suite de l'extraction. Nous mesurons la quantité de lysat obtenu à l'aide d'une pipette et nous ajoutons le même volume d'éthanol 70% en mélangeant correctement. Nous

transposons le tout dans une colonne filtrée "High Pure" avant de centrifuger à 8 000 g pendant 20 secondes à RT, vu que nous obtenons un lysat de plus de 700uL (capacité maximale de la colonne) nous devons répéter cette étape deux fois. Après cette étape, les acides nucléiques sont fixés à la membrane, nous pouvons donc éliminer la solution qui a traversé la membrane avant de continuer. Nous procédons à un premier lavage en ajoutant 700 uL du Buffer RW1 avant de centrifuger à 8 000g pendant 20 secondes. Nous effectuons encore deux lavages en ajoutant 500 uL de Buffer RPE en centrifugeant à 8 000g à RT, entre les deux lavages pendant 20 secondes et après le deuxième lavage pendant 2 minutes. Avant de procéder à l'éluion, nous séchons la membrane en centrifugeant à vitesse maximale pendant 2 minutes. La colonne est ensuite placée sur un tube stérile de 1,5 ml, nous ajoutons 30 uL d'eau RNase free directement sur le filtre et nous centrifugeons pendant 1 minute à 8 000g à RT, l'ARN purifié se décroche alors du filtre et est récolté.

### **3.2. Transcription inverse :**

Nous effectuons la transcription inverse avec le kit FastGene (FastGene Scriptase II Ready Mix ; Nippon Genetics ; Düren, Germany). L'ARN précédemment extrait est dilué pour obtenir une quantité de 1 µg par échantillon, on ajoute 4 µl du kit FastGene qui contient des amorces aléatoires ainsi que l'enzyme transcriptase qui permet la formation des ADNc. Les échantillons sont ensuite placés dans le thermocycleur SimpliAmp™ (Thermal Cycler) et le processus de transcription est lancé.

### **3.3. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel :**

Une fois la réaction de transcription inverse terminée, nous obtenons les ADN complémentaires qui reflètent les niveaux d'ARN messagers présents dans les utérus de souris précédemment prélevés. La réaction de PCR en temps réel (qPCR) est une technique de biologie moléculaire permettant d'amplifier et de quantifier les quantités d'ADNc à l'aide de molécules fluorescentes, ici le SYBRGreen (SYBER Green PCR Master Mix). Ce fluorophore assure le marquage des doubles brins d'ADN au fur et à mesure de leur amplification (**Tableau 1**). Nous diluons chaque échantillon d'ADNc obtenu suite à la transcription inverse 10x dans de l'eau RNase-free. Pour permettre la réaction, nous déposons 10µl de mix PCR ainsi que 2 µl d'ADNc dilué par puit dans une plaque "LightCycler480 Multiwell 96 White". Nous testons chaque échantillon en duplicata. Les plaques sont ensuite centrifugées très brièvement avant d'être déposées dans le thermocycleur (QuantStudio 5, ThermoFischer) afin de procéder à l'amplification. Pour ce faire, des étapes successives sont effectuées, tout d'abord une première phase d'incubation à 94°C pendant 15 minutes afin de dénaturer les doubles brins d'ADN. La seconde phase d'amplification est composée d'un cycle de 3 étapes qui est répété 45 fois, ces trois étapes sont, la dénaturation de l'ADN bicaténaire (15 secondes à 94°C), l'hybridation des amorces (30 secondes à 60°C) et enfin l'élongation des nouveaux brins d'ADN (20 secondes à 72°C). Le **tableau 2** reprend les différentes amorces utilisées lors des différentes PCR effectuées.

### **3.4. Quantification des ARNm suite à la PCR :**

L'expression des gènes a ensuite été analysée grâce à la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Tous les échantillons ont été réalisés en duplicata et les gènes de référence GAPDH et RPLP0 ont été utilisés afin de normaliser les niveaux d'expression des gènes, en accord avec ce que *Lin et al.* ont conseillé dans leur étude sur les utérus de souris <sup>72</sup>.

**Tableau 1: Mix PCR**

Réactifs	Volume par puit
SYBER Green PCR Master Mix (2x)	6 uL
Amorces sens (20 µM)	0,6 uL
Amorces Anti-sens (20 µM)	0,6 uL
H2O <i>RNase free</i>	2,8 uL

**Tableau 2: Amorces PCR murines**

Nom du gène	Séquences des amorces	Nombre de bases	Taille du produit
mGAPDH	Sens : 5' GGT-GGA-CCT-CAT-GGC-CTA-CA 3' Anti-sens : 5' CTC-TCT-TGC-TCA-GTG-TCC-TTG-CT 3'	20 23	82
mRPLP0	Sens : 5' GGA-CCC-GAG-AAG-ACC-TCC-TT 3' Anti-sens : 5' GCA-CAT-CAC-TCA-GAA-TTT-CAA-TGG 3'	20 24	85
mIL6	Sens : 5' ACC-TGG-AGT-ACA-TGA-AGA-ACA-ACT-T 3' Anti-sens : 5' GCT-CTT-GGT-TGA-AGA-TAT-GAA-TTA-GA 3'	25 26	102
mIL10	Sens : 5' GCT-CTT-ACT-GAC-TGG-CAT-GAG 3' Anti-sens : 5' CGC-AGC-TCT-AGG-AGC-ATG-TG 3'	20 21	105
mMCP1	- Sens : 5' GCT-ACA-AGA-GGA-TCA-CCA-GCA-G 3' Anti-sens : 5' GTC-TGG-ACC-CAT-TCC-TTC-TTG-G 3'	22 21	132
mTGFB	Sens : 5' CGT-CAC-TGG-AGT-TGT-ACG-GCA-G 3' Anti-sens : 5' CGT-TTG-GGG-CTG-ATC-CCG-TTG 3'	18 20	109
mVEGF	Sens : 5' GTC-CTG-TGT-GCC-GCT-GAT 3' Anti-sens : 5' AGG-TTT-GAT-CCG-CAT-GAT-CT 3'	20 21	101
mTNFa	Sens : 5' TCT-TCT-CAT-TCC-TGC-TTG-TGG 3' Anti-sens : 5' GAG-GCC-ATT-TGG-GAA-CTT-CT 3'	22 22	106
mCox2	Sens : 5' GCG-ACA-TAC-TCA-AGC-AGG-AGC-A 3' Anti-sens : 5' AGT-GGT-AAC-CGC-TCA-GGT-GTT-G 3'	22 22	132
muPA	Sens : 5' AGA-AGC-GAC-CCT-GGT-GCT-ATG-T 3' Anti-sens : 5' CCA-CAC-TGG-AAG-CCT-TGT-TGG-T 3'	22 22	145
mCol 1A1	Sens 5' CCT-CAG-GGT-ATT-GCT-GGA-CAA-C 3' Anti-sens 5' CAG-AAG-GAC-CTT-GTT-TGC-CAG-G 3'	22 22	145
mCol 3A1	Sens 5' AGG-AGT-GGA-GCA-GTG-GTT-AG 3' Anti-sens 5' CTG-AGG-TCA-GGT-CAG-GAA-GC 3'	20 20	158
mMMP2	Sens : 5' CAA-GGA-TGG-ACT-CCT-GGC-ACA-T 3' Anti-sens : 5' TAC-TCG-CCA-TCA-GCG-TTC-CCA-T 3'	22 22	138
mSNAI1	Sens : 5' TGT-CTG-CAC-GAC-CTG-TGG-AAA-G 3' Anti-sens : 5' CTT-CAC-ATC-CGA-GTG-GGT-TTG-G 3'	22 22	163

## MANIPULATIONS *IN VITRO* :

### 1. Lignées cellulaires utilisées :

Dans nos expériences *in vitro*, nous avons travaillé sur deux lignées cellulaires, les cellules 12z (ABM, T0764) et les cellules hESC (ABM, T0533). Les cellules 12z sont des cellules épithéliales endométriales humaines issues de lésions d'endométriose, ce sont des cellules immortalisées à l'aide du virus SV40. Ces cellules sont préservées dans un milieu DMEM/F-12 supplémenté avec 10% de FBS, 1% de P/S et 1% de glutamine. Les cellules hESC quant à elles sont des cellules stromales endométriales humaines immortalisées provenant d'une patiente saine, elles sont conservées dans du milieu DMEM/F-12 supplémenté avec 10% de FBS, 2% de sodium bicarbonate, 1% de P/S, 0,2% de sodium pyruvate et 0,1% de Gentamycine sulfate.

### 2. Test de confluence :

Afin d'identifier la concentration optimale de S1P à utiliser *in vitro*, les lignées cellulaires hESC et 12z ont été traitées avec différentes concentrations croissantes de S1P (Sigma-Aldrich) (10, 100 et 1000 nM). Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96-puits, avant d'être incubées pendant 72 heures. La confluence cellulaire a été mesurée en temps réel à l'aide du système Incucyte® (Sartorius), avec acquisition d'images toutes les 6 heures.

### 3. RT-qPCR :

Afin d'observer et de quantifier la présence des différents acteurs de la voie S1P dans les deux lignées cellulaires étudiées, une analyse RT-qPCR a été effectuée. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96-puits et traitées soit avec le véhicule (DMSO) soit avec du S1P à 100 nM durant 6 ou 24 heures. Les étapes de la RT-qPCR sont les mêmes que celles décrites précédemment sur les tissus utérins, à l'exception du kit d'extraction d'ARN, adapté ici aux cellules (RNease mini kit, Qiagen). Pour la PCR, nous utilisons des amorces spécifiques ciblant les principaux acteurs clés de la voie S1P, incluant les récepteurs, les kinases, les phosphatases, la lyase et le transporteur membranaire (**Tableau 3**).

### 4. Test de prolifération :

Dans le but d'étudier la prolifération des cellules 12z et hESC traitées avec différentes doses de traitements, nous avons utilisé le kit CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Lot 2942308 Réf. C7026 by Thermo Fisher Scientific).

#### 4.1. Ensemencement :

Pour commencer, nous avonsensemencé des cellules de chaque lignée cellulaire dans des plaques 96-puits avec leur milieu spécifique (200 µl par puit). Après plusieurs tests de confluence, nous avons décidé d'ensemencer les cellules 12z à hauteur de 5 000 cellules par puits et les hESC à hauteur de 15

000 cellules par puits. Après environ 24h d'incubation à 37°C, nous avons déprivé les cellules dans du milieu contenant 2% de FBS. Au minimum 6h plus tard, nous avons débuté les traitements. Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de SKI-5C et de FTY720 allant de 0,1 uM à 20 uM selon le plan en **annexe**. Pour les contrôles, nous avons utilisés les véhicules correspondant : DMSO pour le FTY720 et méthyl acétate pour le SKI-5C. Chaque condition a été effectuée en triplicat et nous avons préparé 3 plaques distinctes, arrêtées à 24, 48 et 72 heures pour pouvoir observer l'évolution dans le temps. Les plaques ont ensuite été arrêtées aux temps prévus et puis congelées à sec à -80°C.

#### **4.2. Test de prolifération CyQUANT :**

Les plaques sont laissées à température ambiante pendant environ vingt minutes avant le début de l'expérience. Nous avons ensuite préparé le mix réactionnel pour un volume de 200 µl par puits, en prévoyant une quantité suffisante pour la courbe étalon. Le mélange CyQUANT a été constitué en diluant le Cell Lysis Buffer à 1/20 dans de l'eau RNase free, puis en ajoutant le colorant CyQUANT GR, dilué 1/400 dans ce mélange. Pour préparer la courbe étalon, nous avons dilué le DNA standard (100ug/ml) à 1/100 dans le mix afin d'obtenir une concentration de 1000 ng/ml. A partir de cette solution, nous avons réalisé des dilutions successives afin d'obtenir les concentrations nécessaires à notre courbe standard conformément au **tableau 4**. Chaque concentration de la courbe étalon a été déposée en duplicat sur l'une des plaques 96-puits, et 200 µl du mix CyQUANT ont été ajoutés dans chaque puit contenant des cellules. Le CyQUANT est un fluorochrome qui se lie aux doubles brins d'ADN, il a été détecté à l'aide du lecteur SpectraMax (SpectraMax® i3, Molecular Devices), nous permettant ainsi de quantifier la fluorescence émise par chaque puit et de refléter la quantité d'ADN présente.

#### **5. Test de migration :**

Afin d'observer les capacités migratoires des cellules testées dans différentes conditions, nous avons eu recours à un « Scratch wound assay ». Pour ce faire, nous avonsensemencé les cellules de chaque lignée dans leur milieu spécifique contenant 10% de FBS respectifs (10 000 cellules par puits pour les 12z et 15 000 cellules par puits pour les hESC) dans des plaques 96-puits Incucyte® (Sartorius, BA-04855). Nous avons ensuite laissé les plaques pendant 4 jours dans un incubateur à 37°C. Le 4ème jour, nous avons déprivé les cellules avec du milieu 2% de FBS. Six heures plus tard, nous avons utilisé l'Incucyte® Woundmaker Tool (Sartorius, Cat. No. 4563), un outil permettant de tracer une brèche uniforme dans chaque puits. Nous avons ensuite stimulé les cellules avec les différentes conditions d'inhibiteurs à tester, chaque condition ayant été réalisée en duplicata. Nous avons utilisé les mêmes concentrations d'inhibiteurs que pour le test de prolifération décrit précédemment. Directement après la stimulation, nous avons placé les plaques dans l'Incucyte, précédemment calibré pour prendre une photo au centre de chaque puits avec un grossissement 10x toutes les 6h pendant 48h pour la lignée cellulaire

hESC et pendant 24h pour la lignée cellulaire 12z. Cette méthode nous a permis d'observer la capacité des cellules à recoloniser la brèche, traduisant leur capacité de migration. Le logiciel Incucyte effectue lui-même, sur demande, une analyse de la confluence des cellules sur les photos prises. Nous avons enfin récupéré les données ainsi que les images afin de comparer l'évolution de la confluence en fonction des différentes doses d'inhibiteurs et du temps.

**Tableau 3: Amorces PCR humaines**

Nom du gène	Séquences des amorces	Nombre de bases	Taille du produit
hGAPDH	Sens 5' TGC-ACC-ACC-AAC-TGC-TTA-GC 3' Anti-sens 5' GGC-ATG-GAC-TGT-GGT-CAT-GAG 3'	20 21	117
hB2M	Sens : 5' GC-TGT-CTC-CAT-GTT-TGA-TGT-ATC-T 3' Anti-sens : 5' CT-CTG-CTC-CCC-ACC-TCT-AAG-T 3'	24 21	84
huPA	Sens : 5' GGC-TTA-ACT-CCA-ACA-CGC-AAG-G 3' Anti-sens : 5' CCT-CCT-TGG-AAC-GGA-TCT-TCA-G 3'	22 22	129
hTIMP2	Sens 5' GAG-TGT-GAC-CGT-GGA-GAG-AA 3' Anti-sens 5' GAG-GAG-GAG-GAG-GAG-GAG-GA 3'	20 20	145
hS1PR1	Sens : 5' CTC-TTC-TGC-ACC-ACC-GTC-TT 3' Anti-sens : 5' CGA-CTG-GCC-TTG-GAG-ATG-TT 3'	20 20	128
hS1PR2	Sens : 5' TGT-TGC-TGG-TCC-TCA-GAC-GCT-A 3' Anti-sens : 5' AGT-GGG-CTT-TGT-AGA-GGA-CAG-G 3'	22 22	149
hS1PR3	Sens : 5' GCC-TTG- CAG-AAC-GAG-AGC-CTA 3' Anti-sens : 5' CTG-CCA-GTT-TCC-CCA-CGT-AA 3'	21 20	246
hS1PR4	Sens : 5' GTG-TAT-GGC-TGC-ATC-GGT-CTG-T 3' Anti-sens : 5' GAG-CAC-ATA-GCC-CTT-GGA-GTA-G 3'	22 22	135
hS1PR5	Sens : 5' GTG-TAC-ACC-AAA-TGC-CCA-GC 3' Anti-sens : 5' AGC-ACT-GTG-CAA-AAG-TCT-CCT 3'	20 21	101
hSPHK1	Sens : 5' GCT-TCT-GTC-AAC-CAC-TAT-GCT-GG 3' Anti-sens : 5' ACT-GAG-CAC-AGA-ATA-GAG-CCG-C 3'	23 22	153
hSPHK2	Sens : 5' GGT-GCC-AAT-GAT-CTC-TGA-AGC-TG 3' Anti-sens : 5' CTC-CAG-ACA-CAG-TGA-CAA-TGC-C 3'	23 22	128
hSGPP1	Sens : 5' CTG-GAG-GTC-TTC-TAC-AAC-TCG-G 3' Anti-sens : 5' GTG-AAC-TCC-AGC-AGG-GAA-TGA-G 3'	22 22	151
hSGPP2	Sens : 5' ATG-GCT-GTG-TTC-TCT-ACG-C 3' Anti-sens : 5' GGT-AGG-TCA-GAG-CAA-TGA-GGA-C 3'	19 22	115
hSGPL	Sens : 5' GGA-AAG-CCT-CAG-GAG-CTG-TGT-A 3' Anti-sens : 5' CTG-CCT-CTA-ACT-TCC-GCA-ATC-C 3'	22 22	132

**Tableau 4: Courbe standard CyQUANT**

{ng/ml}	µL ADN	µL mix
0	0	400
10	4	396
50	20	380
100	40	360
200	80	320
400	160	240
600	240	160
800	320	80
1000	400	0



---

---

# Objectifs

---

---

---

# OBJECTIFS

---

L'adénomyose est une pathologie gynécologique encore mal comprise, fréquemment associée à l'endométriose et pour laquelle aucun traitement curatif, hormis l'hystérectomie, n'est actuellement disponible. Bien que la voie du sphingosine-1-phosphate (S1P) soit déjà bien documentée dans le contexte de l'endométriose, son rôle dans l'adénomyose reste largement inexploré. A ce jour, une seule étude suggère son implication dans cette pathologie

Ce travail a pour objectif d'évaluer le rôle de la voie du sphingosine-1-phosphate dans la physiopathologie de l'adénomyose et d'examiner le potentiel thérapeutique de son inhibition.

Pour ce faire, deux volets complémentaires ont été développés :

- *In vivo*, l'effet de deux inhibiteurs de la voie S1P (FTY720 et SKI-5C) a été évalué dans un modèle murin d'adénomyose induite, en comparant deux fenêtres d'administration (précoce et tardive). L'impact des traitements a été analysé par des approches histologiques et transcriptionnelles, en ciblant des marqueurs de fibrose, inflammation, angiogenèse et transition épithélio-mésenchymateuse.
- *In vitro*, deux lignées cellulaires endométriales humaines (stromale hESC et épithéliale 12Z) ont été utilisées pour :
  - Caractériser l'expression basale et la modulation des principaux acteurs de la voie S1P après une stimulation au S1P.
  - Analyser les effets fonctionnels des inhibiteurs sur la prolifération, la migration cellulaire et l'expression de marqueurs du remodelage matriciel.

---

---

# Résultats

---

---

---

# RÉSULTATS

---

## ÉTUDES *IN VIVO*

### 1. Analyse histologique du modèle murin

#### 1.1. Description du modèle

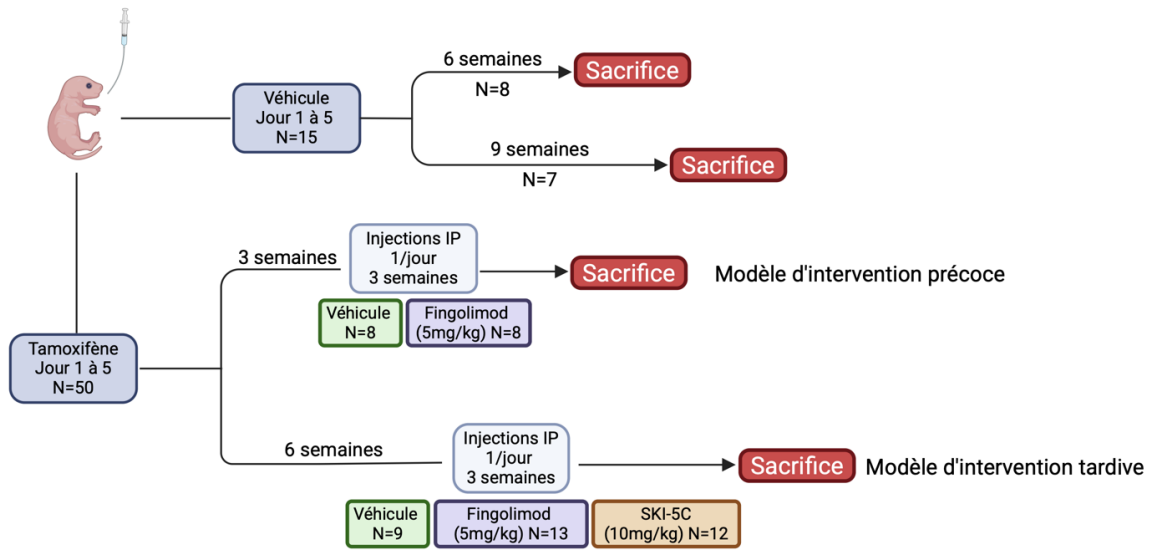
Afin d'évaluer l'efficacité de ces deux inhibiteurs, nous avons utilisé un modèle murin. Dans ce modèle initialement décrit par *Green et al.*<sup>73</sup>, les souriceaux sont gavés avec du tamoxifène ou son véhicule pendant les 4 premiers jours après la naissance. Nous avons choisi d'administrer les inhibiteurs selon 2 schémas expérimentaux différents afin de tester un modèle d'intervention précoce ou tardive.

Dans le cadre du modèle d'intervention précoce, les traitements ont débuté lors du sevrage des souris, à savoir lorsque ces dernières étaient âgées de 3 semaines. Le FTY720 ou son véhicule ont été injectés quotidiennement par voie intrapéritonéale pendant 3 semaines. Le SKI-5C n'a pas été testé dans le modèle d'intervention précoce.

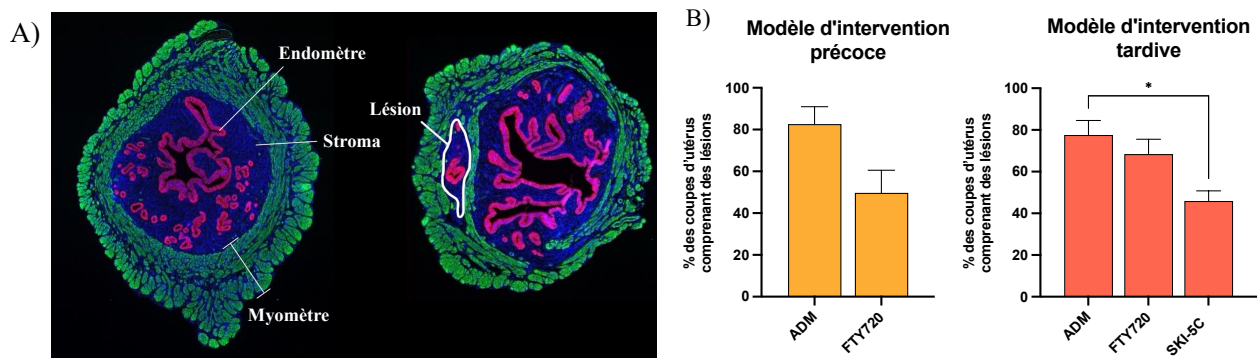
Dans le cadre du modèle d'intervention tardive, les traitements ont débuté lorsque les lésions d'adénomyose s'étaient développées de manière plus importante. Nous avons choisi de débiter les traitements lorsque les souris étaient âgées de 6 semaines. Dans ce cas, les 2 inhibiteurs, à savoir le FTY720 et le SKI-5C, ont été administrés (**Fig. 5**).

#### 1.2. Comparaison de l'atteinte des utérus en fonction des modèles d'intervention

Après sacrifice, une partie des utérus a été utilisée pour faire des immunohistochimies marquant en vert les cellules musculaires du myomètre grâce à l'anticorps anti-  $\alpha$ SMA/FITC, en rouge les cellules épithéliales composant les glandes endométriales avec l'anticorps anti-EpCAM. Le stroma quant à lui apparaît en bleu grâce à la coloration au DAPI (**Fig. 6.A**). Pour l'évaluation des lésions d'adénomyose, un minimum de 15 sections transversales par souris a été analysées. Ces coupes étaient espacées d'au moins 50 $\mu$ m afin de garantir l'indépendance des observations, en sélectionnant quasiment systématiquement la première coupe de chaque ruban de 10 sections sériées. Pour chaque animal, le nombre de sections présentant des lésions d'ADM a été comparé au nombre de sections indemnes, permettant de calculer un pourcentage de sections atteintes. Dans le modèle d'intervention précoce, le traitement par FTY720 semble réduire la proportion de sections présentant des lésions d'ADM, suggérant un effet protecteur de ce modulateur de la voie S1P lorsqu'il est administré avant l'établissement des lésions. En revanche, dans le modèle d'intervention tardive (modèle thérapeutique), le FTY720 ne présente pas d'effet significatif sur la fréquence des lésions. Dans ce modèle, le traitement par SKI-5C semble induire une diminution du pourcentage de coupes présentant des lésions, suggérant une efficacité potentielle une fois les lésions établies (**Fig. 6.B**). Évaluation de l'aire des glandes ectopiques en fonction de leur localisation.



**Figure 5. Modèle murin d'intervention, précoce ou tardive : protocoles expérimentaux.** Les souriceaux reçoivent par gavage du tamoxifène ou son véhicule (huile d'arachide, lécithine et lait concentré (2 :0.2 :3, v/v)) une fois par jour pendant les premiers jours de vie. Sur le bas du schéma, la différence entre le modèle d'intervention précoce et tardif est renseignée. Le modèle d'intervention précoce comporte 3 semaines entre la fin du gavage et le début des traitements, seul le FTY720 ainsi que son véhicule (DMSO) ont été administrés dans ce modèle. Dans le modèle d'intervention tardif, 6 semaines séparent la fin du gavage et le début des traitements. Le SKI-5C à raison de 10mg/kg, a été ajouté par rapport au modèle précoce. Dans les deux modèles, les traitements ont été administrés pendant 3 semaines avec une injection intrapéritonéale par jour et le sacrifice réalisé le lendemain de la dernière injection.



**Figure 6. Etude histologique des lésions d'adénomyose sur les différents modèles murins.**

**A)** Coupe histologique transversale d'une corne utérine murine, provenant d'une souris saine (à gauche) et atteinte d'adénomyose (à droite). Les cellules épithéliales endométriales sont mises en évidence par un anticorps anti-EpCAM en rouge, les cellules musculaires lisses composant le myomètre sont marquées par un anticorps anti- $\alpha$ SMA en vert, et une coloration bleue au DAPI permet de visualiser les noyaux des cellules composant le stroma. Les lésions sont visibles par leur invasion dans la couche de myomètre marquée en vert, entourées sur la coupe de droite. **B)** Graphiques représentant le nombre de coupes présentant des lésions par rapport au nombre de coupes saines dans chaque groupe, exprimé en pourcentage de sections atteintes. Analyse statistique avec un test ANOVA1 : \* $p < 0,05$  ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Afin d'évaluer de manière plus précise l'impact des inhibiteurs de la voie S1P sur la progression des lésions d'adénomyose au sein du myomètre, une analyse quantitative de la distribution a été réalisée en fonction de leur distance par rapport à la jonction endomètre-myomètre.

L'aire occupée par les glandes ectopiques au sein du myomètre a également été quantifiée. Dans un premier temps, la limite anatomique du myomètre, marqué en vert, a été tracée manuellement à l'aide du logiciel Adobe Photoshop. A partir de cette ligne de démarcation, une analyse automatisée a été conduite à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image. Le programme a mesuré, par tranches successives de 10  $\mu\text{m}$  depuis la jonction endomètre-myomètre et en direction du myomètre profond, l'aire totale occupée par les structures glandulaires immunomarquées. Ce type d'examen a l'avantage d'offrir une double analyse de la sévérité des lésions. D'une part, elle renseigne sur la taille globale des lésions à chaque distance  $t$ , d'autre part, elle permet d'estimer la profondeur d'invasion des glandes dans le myomètre utérin, considérée comme un indicateur clé de la progression et de la sévérité de l'adénomyose.

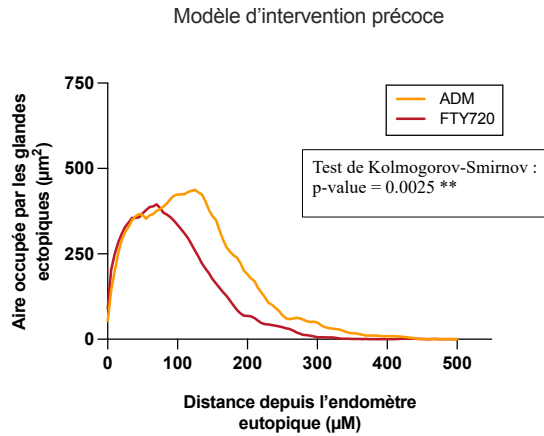
Dans le modèle préventif (**Fig. 7.A**), l'analyse de la distribution des glandes ectopiques en fonction de la profondeur dans le myomètre révèle un effet significatif du traitement au FTY720. La courbe représentant les souris atteintes d'ADM non traitées est décalée vers la droite par rapport à celle des souris traitées, indiquant une invasion plus profonde des glandes dans le compartiment myométrial en l'absence de traitement. De plus, au-delà de 100  $\mu\text{m}$  de profondeur, l'aire moyenne occupée par les glandes ectopiques est réduite dans le groupe traité au FTY720 par rapport au groupe ADM non traité. Cette observation suggère non seulement une réduction de la profondeur d'invasion, mais également une diminution globale de l'aire lésionnelle dans les zones plus profondes du myomètre.

Dans le modèle d'intervention tardive (**Fig. 7.B**), l'analyse de la distribution des glandes ectopiques selon leur profondeur dans le myomètre montre un profil différent selon le traitement administré. Les courbes représentant les souris atteintes d'ADM non traitées et celles traitées avec le Fingolimod sont quasiment superposées, indiquant que ce traitement n'a pas d'effet significatif sur la profondeur ou l'étendue des lésions une fois celles-ci établies.

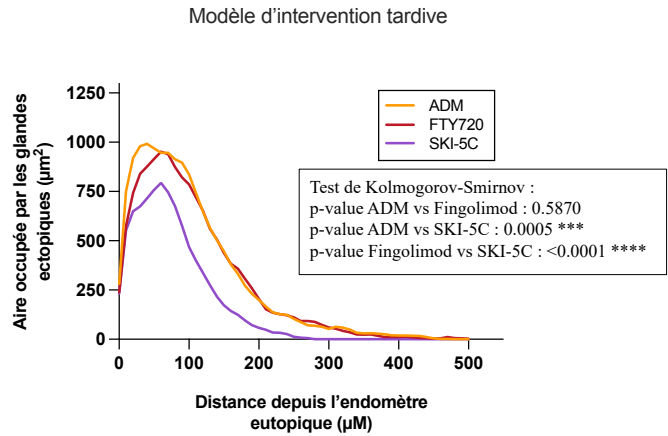
En revanche, la courbe correspondant au groupe traité avec le SKI-5C se distingue nettement. Elle est à la fois plus basse et décalée vers la gauche par rapport à celle du groupe ADM, suggérant une réduction globale de l'aire des lésions ainsi qu'une moindre profondeur d'invasion dans le myomètre. Notamment, la diminution marquée de l'aire occupée par les glandes ectopiques dès les premières tranches (proches de la jonction endomètre-myomètre) indique une réduction significative dès les couches superficielles.

## Distribution des glandes ectopiques

A)



B)



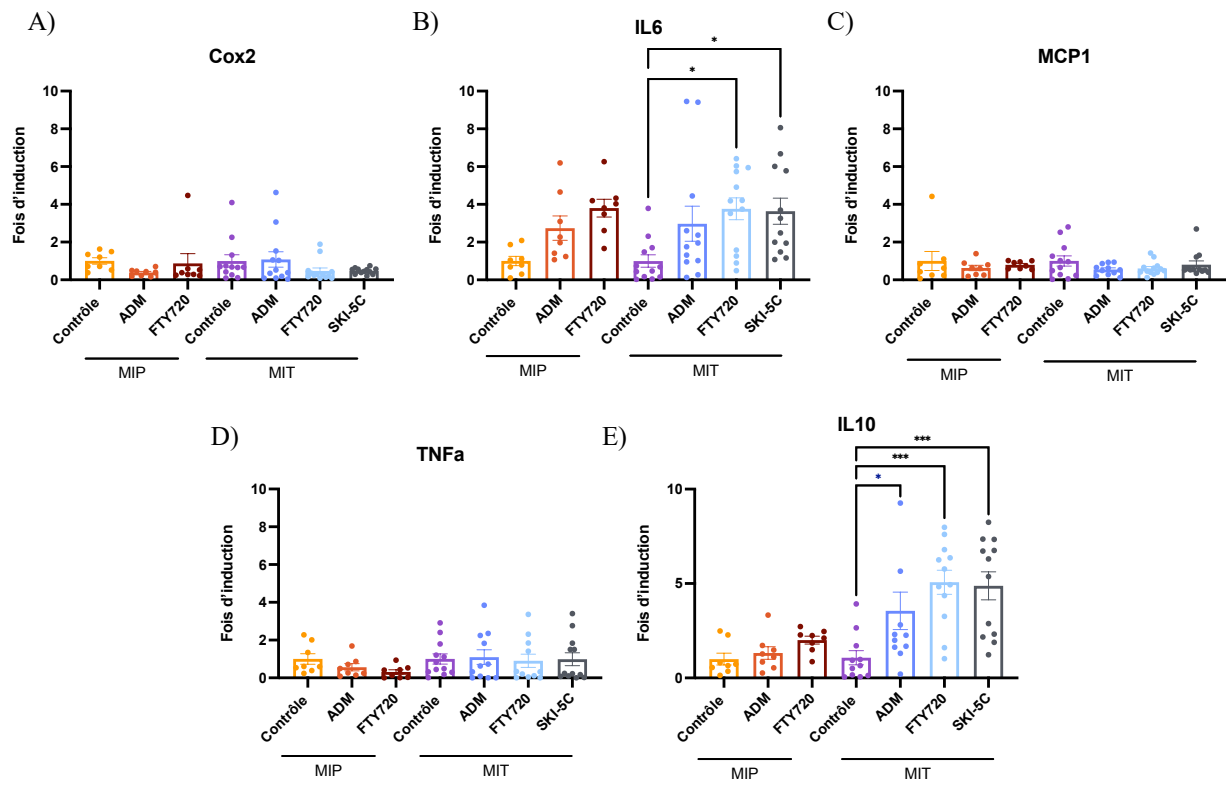
**Figure 7. Quantification de l'aire des glandes ectopiques en fonction de la distance avec l'endomètre eutopique.** **A)** Quantification dans le modèle d'intervention précoce. L'axe des Y représente l'aire occupée par les glandes ectopiques ( $\mu\text{m}^2$ ), tandis que l'axe des X représente la distance depuis l'endomètre eutopique ( $\mu\text{m}$ ). Le groupe traité au FTY720 est représenté en rouge, tandis que le groupe contrôle adénomyose est représenté en jaune. **B)** Même représentation pour le groupe d'intervention tardive, la condition SKI-5C a été ajoutée en violet. La significativité pour ces deux derniers graphes a été étudiée via un test de Kolmogorov-Smirnoff.

Nos résultats indiquent que l'administration précoce de FTY720 permet de limiter la progression des lésions d'adénomyose, tandis qu'un traitement initié à un stade plus avancé ne présente pas d'effet notable. En revanche, l'inhibiteur SKI5C semble efficace pour réduire la progression des lésions lorsque celles-ci sont déjà bien établies. Ces données suggèrent que l'efficacité des inhibiteurs de la voie S1P est étroitement liée au stade d'évolution de la pathologie au moment de l'intervention.

## **2. Profil d'expression génique**

### **2.1. Marqueurs de l'inflammation (Cox2, IL6, MCP1, TNF $\alpha$ , IL10)**

Pour évaluer le profil inflammatoire utérin induit par nos différents traitements, nous avons étudié 5 gènes cibles par réaction de polymérisation en chaîne : Cox2 ; IL6 ; MCP1 ; TNF $\alpha$  et IL10 (**Fig. 8**). Les 4 premiers traduisent différentes facettes de la phase aigüe de l'inflammation ; Cox2 reflète l'activation de la synthèse de prostaglandines, IL6 témoigne de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, MCP1 indique le recrutement de macrophages sur le site et TNF $\alpha$  amplifie la cascade inflammatoire. A l'inverse, IL10 joue un rôle dans la régulation de l'inflammation, c'est une cytokine anti-inflammatoire. Alors que l'expression de Cox2, MCP1 et TNF $\alpha$  ne présentait pas de différences significatives entre les groupes, nous avons observé des variations marquées pour IL-6 et IL-10, ce qui suggère une modulation partielle du profil inflammatoire utérin par les traitements. Le profil de la cytokine inflammatoire IL6 (**Fig. 8.B**), montre une augmentation significative entre la condition contrôle et les deux traitements uniquement dans le modèle d'intervention tardive, la condition adénomyose semble aussi augmentée par rapport au contrôle mais ce résultat est non significatif. L'interleukine 10 (**Fig. 8.E**) montre le même profil, avec une augmentation significative entre la condition contrôle et les trois autres conditions dans le modèle d'intervention tardif. Aucune différence sur aucun de ces gènes de l'inflammation n'est remarquée pour le modèle d'intervention précoce entre la condition adénomyose et les traitements avec les inhibiteurs.



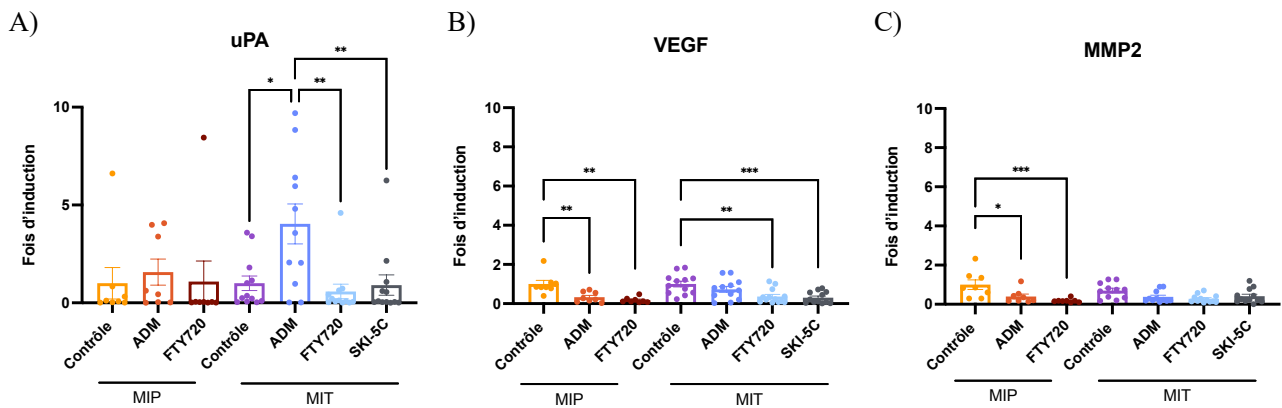
**Figure 8.** Analyse de l'expression génique de Cox2 (A), IL6 (B), MCP1 (C), TNF $\alpha$  (D) et IL10 (E) dans les différents groupes de traitements et de contrôles. MIP = modèle d'intervention précoce ; MIT = modèle d'intervention tardive. Exprimé en fois d'induction par rapport au groupe contrôle, les barres représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Analyse statistique avec un test ANOVA1 : \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## 2.2. Marqueurs de la migration et angiogenèse (uPA, VEGF, MMP2)

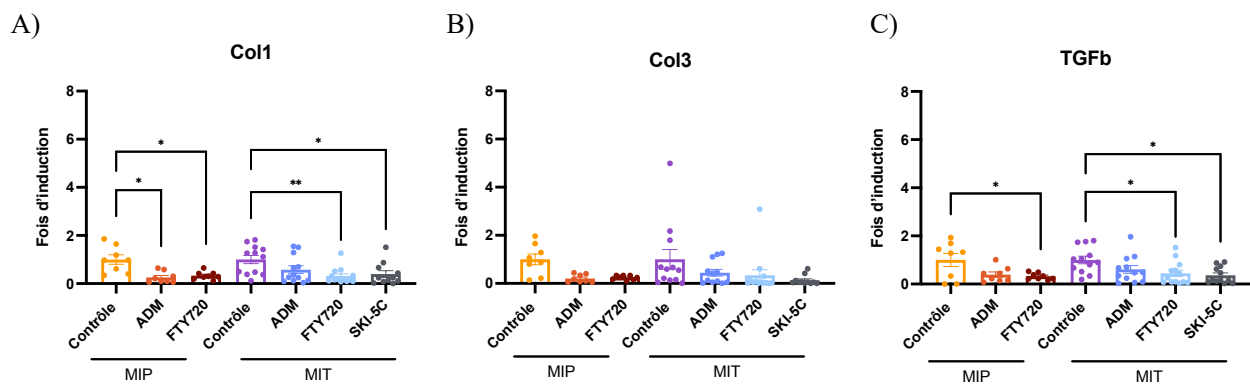
Pour étudier la migration cellulaire *in vivo*, l'analyse de l'expression des gènes uPA, VEGF et MMP2 a été réalisée (**Fig. 9**), ceux-ci sont impliqués dans des étapes successives de la migration. L'urokinase activatrice du plasminogène (uPA) facilite la dégradation de la matrice extracellulaire et le mouvement des cellules, le facteur de croissance endothélial (VEGF) est le principal moteur de l'angiogenèse qui crée un environnement propice à la mobilité cellulaire, et enfin la métalloprotéinase matricielle 2 (MMP2) est capable de remodeler la matrice extracellulaire et d'ouvrir la voie aux cellules migrantes. Le profil de l'urokinase uPA (**Fig. 9.A**) montre une augmentation significative entre la condition contrôle et adénomyose dans le modèle d'intervention tardif, ainsi qu'une diminution significative après traitement autant pour le FTY720 que pour le SKI-5C. Aucune différence n'est visible dans le modèle d'intervention précoce. Le marqueur de l'angiogenèse VEGF (**Fig. 9.B**) quant à lui présente des changements significatifs similaires dans les deux modèles, à savoir une diminution entre les conditions contrôles et les traitements. Dans le modèle d'intervention précoce, on observe cette diminution significative entre la condition contrôle et la condition adénomyose. Dans le profil de la métalloprotéinase 2 (MMP2) (**Fig. 9.C**), une diminution significative est observée entre la condition contrôle et adénomyose, et une diminution d'autant plus importante est remarquée entre la condition contrôle et le traitement au fingolimod. Toutefois, aucune différence n'est visible dans le modèle d'intervention tardive.

## 2.3. Marqueurs de fibrose (Col1, Col3, TGFb)

Afin de tester le niveau de fibrose dans les utérus des souris traitées avec les différents modèles et traitements, le profil des gènes suivants a été établi par réaction de polymérisation en chaîne : Col1, Col3 et TGFb (**Fig. 10**). Les collagènes de type 1 et 3 sont les principaux composants des réseaux fibrotiques, tandis que le TGFb régule l'activation des fibroblastes et la synthèse de collagène. Les profils génétiques du collagène 1 et de TGFb sont similaires, avec une diminution significative de la quantité d'ARN messagers après traitement par rapport à la condition contrôle et ce dans les deux modèles d'intervention. Le collagène 3 quant à lui ne montre aucune différence entre les groupes même si on constate une très légère augmentation dans les deux conditions contrôles.



**Figure 9.** Analyse de l'expression génique de uPA (A), VEGF (B) et MMP2 (C), dans les différents groupes de traitements et de contrôles. MIP = modèle d'intervention précoce ; MIT = modèle d'intervention tardive. Exprimé en fois d'induction par rapport au groupe contrôle, les barres représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Analyse statistique avec un test ANOVA1 : \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



**Figure 10.** Analyse de l'expression génique de Col1 (A), Col3 (B) et TGFb (C), dans les différents groupes de traitements et de contrôles. MIP = modèle d'intervention précoce ; MIT = modèle d'intervention tardive. Exprimé en fois d'induction par rapport au groupe contrôle, les barres représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Analyse statistique avec un test ANOVA1 : \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

#### **2.4. Marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse (Snail) :**

L'une des caractéristiques de l'adénomyose étant le changement phénotypique des cellules, il était intéressant de tester le profil génétique du facteur de transcription Snail (**Fig. 11**). Ce facteur de transcription joue un rôle clé dans la transition épithélio-mésenchymateuse, favorisant le changement de comportement cellulaire épithélial vers un état migratoire et invasif, la mesure de Snail permet une évaluation des phénomènes de plasticité cellulaire *in vivo*. Aucun changement n'est observable dans le modèle d'intervention tardif. Cependant, dans le modèle d'intervention précoce, une diminution significative de Snail est observée entre la condition contrôle et le traitement au fingolimod, ainsi qu'avec la condition adénomyose.

## Snai1

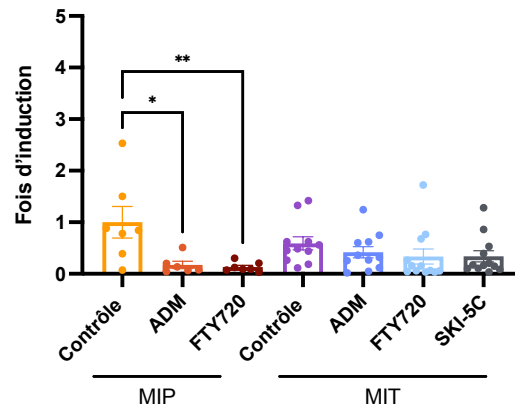


Figure 11. Analyse de l'expression génique de Snai1, dans les différents groupes de traitements et de contrôles. MIP = modèle d'intervention précoce ; MIT = modèle d'intervention tardive. Exprimé en fois d'induction par rapport au groupe contrôle, les barres représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Analyse statistique avec un test ANOVA1 : \*p < 0,05 ; \*\*p < 0,01 ; \*\*\*p < 0,001 ; \*\*\*\*p < 0,0001.

## ÉTUDES *IN VITRO*

### 1. Détermination de la dose optimale de S1P

Afin d'étudier les modulations de la voie du S1P sur les différents critères d'intérêt de ce mémoire, il était d'abord essentiel de déterminer la concentration optimale de S1P à utiliser dans nos conditions expérimentales, sur la base de données issues de la littérature. En effet, une concentration de 98,2 nM de S1P a été mesurée dans des kystes endométriotiques, comparativement à 1,5 nM dans des tissus sains. Par ailleurs, plusieurs études rapportent une augmentation de la prolifération cellulaire des cellules stromales endométriales humaines (hESC) après un traitement avec 125 nM de S1P<sup>61</sup>.

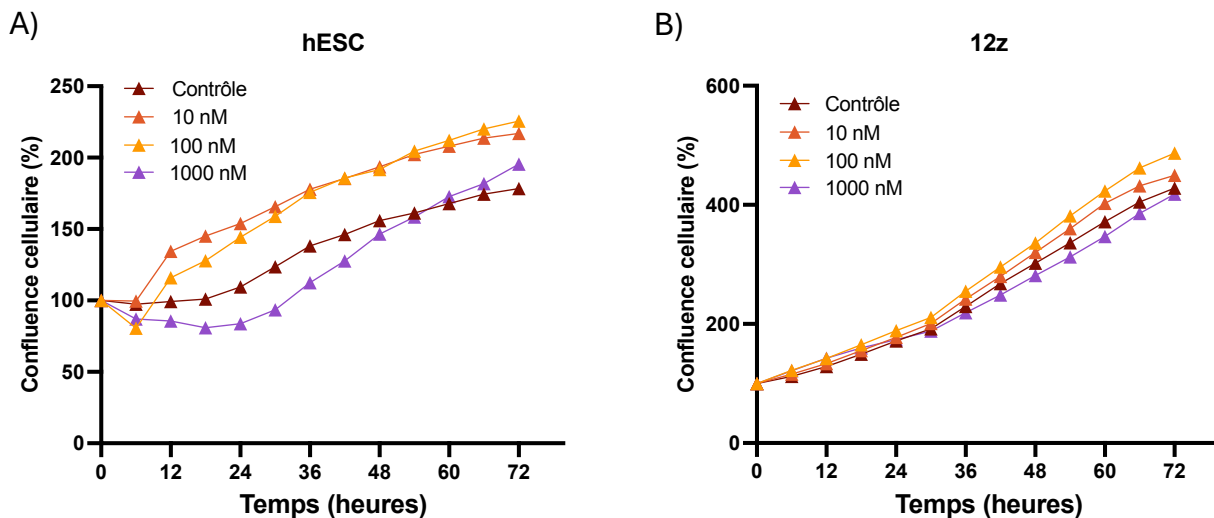
Les deux lignées cellulaires (épithéliales 12z et stromales hESC) ont été exposées à différentes concentrations de S1P pendant 72 heures, et une analyse de la confluence en temps réel a été réalisée par imagerie Incucyte (**Fig. 12**). Dans la lignée hESC, une augmentation de la confluence cellulaire a été observée pour les concentrations de 10 et 100 nM, tandis qu'une diminution transitoire a été notée pour 1000 nM, par rapport à la condition contrôle (**Fig. 12.A**). En ce qui concerne la lignée cellulaire 12z, les variations de la confluence cellulaire en fonction des différentes concentrations de S1P sont faibles, néanmoins, le traitement à 100 nM révèle une légère augmentation de celle-ci. Sur base de ces résultats, la concentration de 100 nM de S1P a été retenue pour les expériences ultérieures.

### 2. Analyse de l'expression des acteurs de la voie S1P dans les deux lignées cellulaire (hESC et 12z) :

Afin de confirmer la présence des principaux acteurs de la voie S1P dans les deux lignées cellulaires (hESC et 12z), ainsi que de pouvoir comparer leurs niveaux d'expression, une analyse génétique par RT-qPCR a été réalisée (**Fig. 13**).

L'analyse PCR montre une forte expression du récepteur S1PR1 dans les deux lignées cellulaires. Dans la lignée cellulaire stromale hESC, les récepteurs sont exprimés dans l'ordre décroissant suivant : S1PR1 suivi de S1PR2, ensuite S1PR3 et S1PR5, exprimés à un niveau comparable, et finalement S1PR4 très faiblement exprimé. Dans la lignée cellulaire épithéliale 12z, on observe également une forte expression du récepteur S1PR1 suivie S1PR2 et S1PR5 (niveaux d'expression similaires), tandis que S1PR3 et S1PR4 sont très faiblement exprimés.

Pour les enzymes, les niveaux d'expression de SPHK1 sont légèrement plus faibles que ceux de SPHK2 dans les deux lignées cellulaires. Concernant les enzymes de dégradation, SGPP1 et SGPL sont exprimées de façon comparable dans les cellules stromales hESC, alors que dans la lignée cellulaire épithéliale 12z, SGPL est plus exprimée. En revanche, la phosphatase SGPP2 montre une expression très faible dans la lignée épithéliale 12z et n'a pas pu être analysée en raison d'une absence d'amplification détectable dans les cellules stromales hESC, traduisant une expression très faible, voire inexistante de celle-ci.



**Figure 12.** Effets dose-dépendants du S1P sur la prolifération cellulaire des lignées hESC (A) et 12z (B).

Les cellules hESC (A) et 12z (B) ont été traitées avec différentes concentrations de S1P (10, 100 ou 1000 nM) ou avec du DMSO, véhicule du S1P (contrôle). La prolifération cellulaire a été évaluée pendant 72 heures en mesurant la confluence cellulaire à l'aide du système Incucyte, avec des prises en image toutes les 6 heures. Les données sont présentées sous forme du pourcentage moyen de confluence cellulaire, pour deux répliquats (N=2). Dans la lignée cellulaire stromale hESC (A), on observe une augmentation de la confluence à 10 et 100 nM. Par contre, dans la lignée cellulaire épithéliale 12z (B), les variations de confluence sont très faibles entre les différentes concentrations de S1P testées.



**Figure 13.** Expression relative des différents gènes de la voie du S1P dans les cellules hESC et 12z sans traitement.

L'expression des ARN messagers des récepteurs (S1PR1-5), des kinases (SPHK1-2) des phosphatases (SGPP1-2) et de la lyase (SGPL) ont été analysés par RT-qPCR, en utilisant la technique SybrGreen, dans les deux lignées cellulaires (hESC et 12z). Les résultats ont été analysés en suivant la méthode  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , normalisés par rapport à l'expression des gènes ubiquitaires GAPDH et B2M, et exprimés en fois d'induction par rapport au récepteur S1PR1.

### **3. Effet du S1P (100nM) sur l'expression des gènes cibles de la voie du S1P :**

Une analyse génique a été réalisée par RT-qPCR après traitement à 100nM de S1P pendant 6 ou 24 heures, dans le but d'évaluer les variations d'expression des différents acteurs de la voie.

#### **3.1. Expression des enzymes de synthèse et de dégradation (SPHKs, SGPPs et SGPL)**

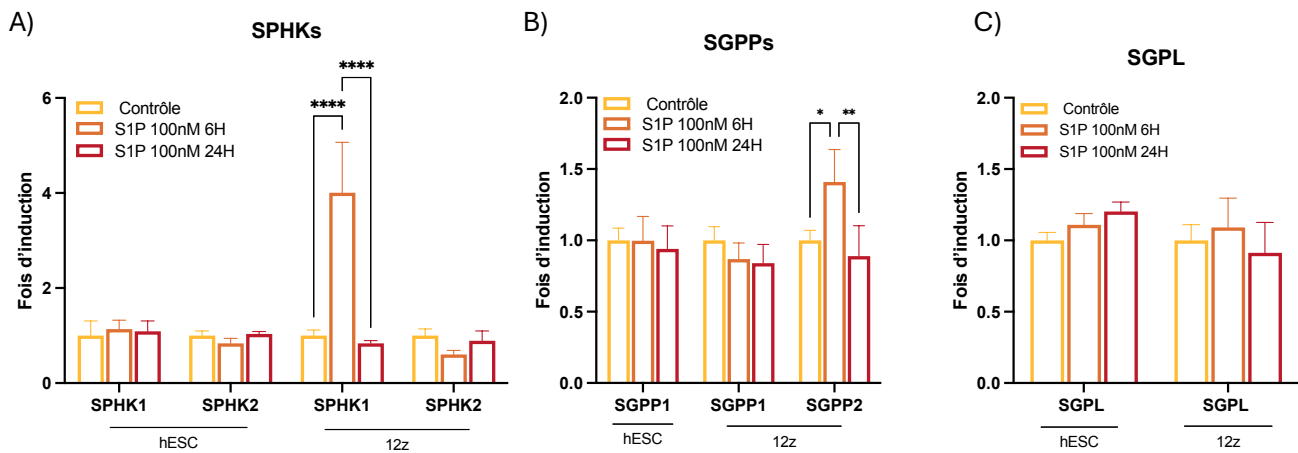
Dans la lignée hESC, aucune modulation significative de l'expression, ni des kinases, ni des enzymes de dégradation, n'a été observée après traitement au S1P (**Fig.14**).

Dans la lignée 12z, le traitement au S1P induit une modulation transitoire de l'expression de la kinase SPHK1 à 6 heures avant de retrouver un niveau comparable au contrôle à 24 heures (**Fig. 14.A**). Un profil similaire est observé pour la phosphatase SGPP2, avec une expression transitoirement augmentée lors du traitement à 6 heures (**Fig. 14.B**). Cependant, aucune modulation n'est observable concernant SPHK2 ni SGPP1.

La S1P lyase, responsable de la dégradation irréversible du S1P au niveau du réticulum endoplasmique, ne montre aucune modification d'expression significative post-traitement, dans aucune des deux lignées (hESC et 12z), signifiant potentiellement que son expression n'est pas dépendante de la présence de S1P.

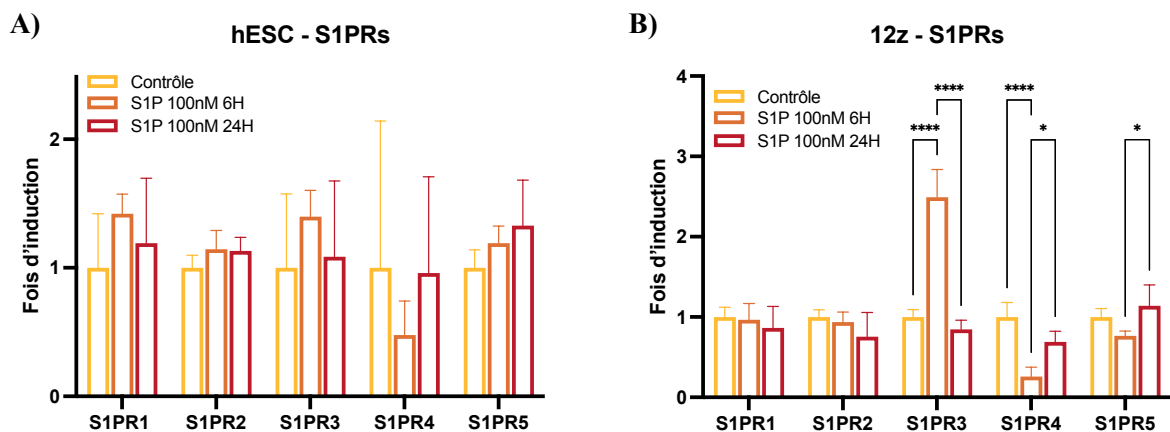
#### **3.2. Expression des récepteurs S1PRs :**

Dans la lignée hESC, aucune modulation de l'expression des différents récepteurs n'est significative. Cependant, une diminution transitoire de l'expression de S1PR4 est observable lors d'une stimulation au S1P pendant 6h (**Fig. 15.A**). Dans la lignée 12z, l'expression de S1PR3 est augmentée après 6 heures de stimulation au S1P et retrouve une expression plus basse et similaire à celle de la condition contrôle après 24 heures de stimulation. Les profils d'expression de S1PR4/5 montrent quant à eux une diminution transitoire après 6 heures de stimulation (**Fig. 15.B**).



**Figure 14. Expression relative des gènes SPHKs, SGPPs et SGPL dans les lignées hESC (A) et 12z (B).**

ARNm des sphingosines kinases (A) (SPHK1 et 2), des phosphatases (B) (SGPP1 et 2) et de la lyase (C) (SGPL) mesurés par RT-qPCR dans les lignées cellulaires hESC et 12z après stimulation avec du S1P à 100 nM pendant 6h (orange) et 24 heures (rouge), comparés aux contrôles non stimulés (jaune). Les résultats ont été analysés en suivant la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , normalisés par rapport aux gènes ubiquitaires GAPDH et B2M. Les données sont exprimées en « fois d'induction » par rapport à la condition contrôle. Les barres représentent la moyenne  $\pm$  SEM, pour un duplicat biologique (N=2). Une analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA1, les significations statistiques sont indiquées comme ceci : \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



**Figure 15. Expression relative des gènes des récepteurs au S1P dans les lignées hESC (A) et 12z (B).**

ARNm des récepteurs au S1P (S1PR1-5) mesurés par RT-qPCR en utilisant le SybrGreen, dans les lignées cellulaires hESC et 12z après stimulation au S1P à une concentration de 100 nM pendant 6h (orange) ou 24 heures (rouge), comparés aux contrôles non stimulés (jaune). Les résultats ont été analysés en suivant la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , normalisés par rapport aux gènes ubiquitaires GAPDH et B2M. Les données sont exprimées en « fois d'induction » par rapport au témoin. Les barres représentent la moyenne  $\pm$  SEM, pour un duplicat biologique (N=2). Une analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA1, les significations statistiques sont indiquées comme ceci : \* $p < 0,05$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

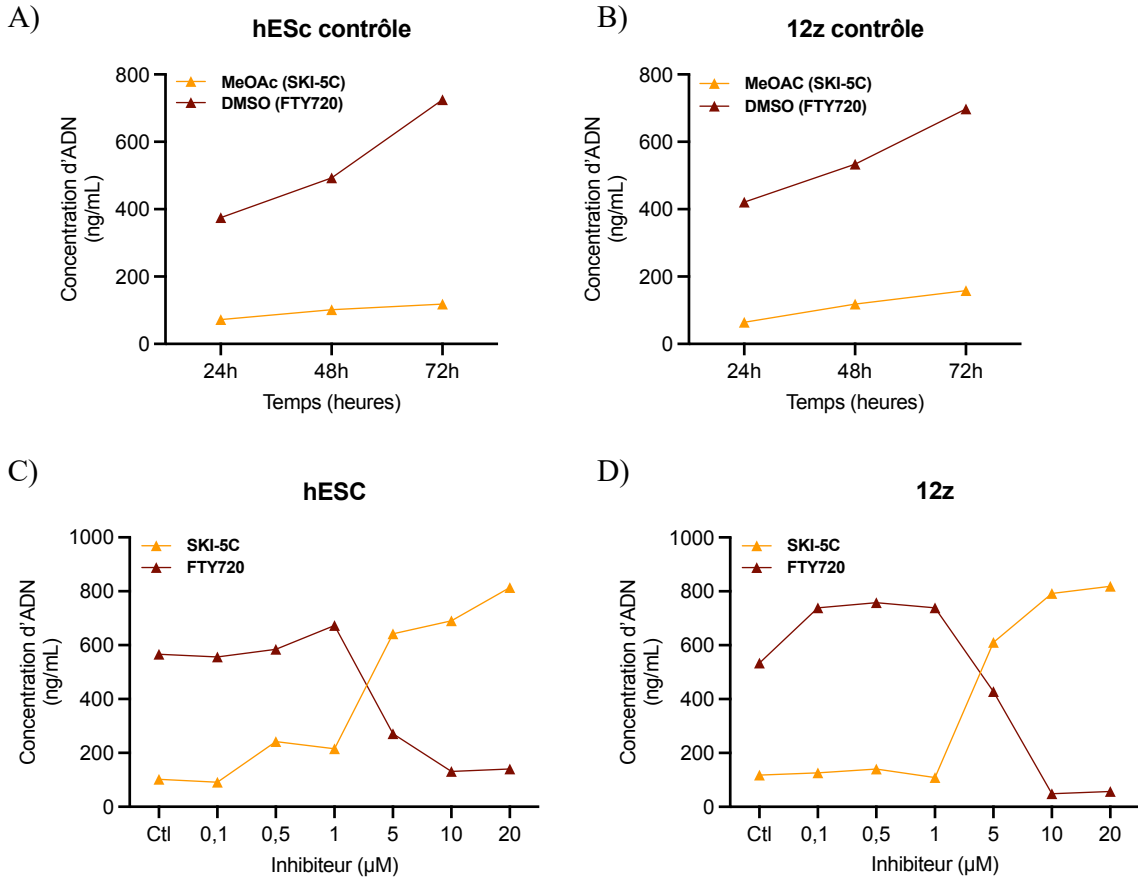
#### 4. Évaluation des inhibiteurs FTY720 et SKI-5C *in Vitro*

##### 4.1. Impact sur la prolifération cellulaire (test CyQUANT)

La prolifération cellulaire a été évaluée par dosage de l'ADN total (test CyQUANT). Les deux lignées cellulaires (hESC et 12z) ont étéensemencées et incubées en présence des solvants correspondants aux inhibiteurs (Fig. 4A-B) ou des inhibiteurs (SKI-5C ou FTY720) à différentes concentrations (de 0,1 à 20  $\mu$ M) (Fig. 4C-D). Le test a été réalisé de façon identique dans trois plaques 96 puits, chacune arrêtée par congélation à sec à 24 heures d'intervalle afin d'obtenir différents timings. Un colorant CyQUANT a ensuite été ajouté, celui-ci permet le marquage des doubles brins d'ADN, permettant ainsi la quantification de la quantité d'ADN présente dans chaque condition.

Les deux inhibiteurs n'ayant pas le même véhicule, pour chaque lignée cellulaire, un test des conditions contrôles a été réalisé. Les cellules (hESC et 12z) ont été traitées avec du méthyl-acétate seul (véhicule du SKI-5C) ou bien du DMSO seul (véhicule du FTY720) à la plus forte concentration (20 $\mu$ M). Dans les deux lignées, les résultats sont comparables ; une prolifération cellulaire continue est observée lors du traitement au DMSO, tandis qu'aucune variation n'est visible dans le traitement au méthyl-acétate, suggérant une toxicité intrinsèque de ce dernier solvant (**Fig. 16.A-B**).

Bien que nous ayons évalué la prolifération cellulaire par dosage de l'ADN total après 24, 48 et 72 heures de traitement avec différentes concentrations de SKI-5C ou de FTY720 (0,1–20  $\mu$ M) sur les 2 lignées cellulaires, seuls les résultats obtenus à 48 heures sont présentés (**Fig. 16 C-D**) Les deux lignées cellulaires présentent un profil similaire. Le traitement avec le SKI-5C induit une augmentation de la quantité d'ADN, dépendante de la dose d'inhibiteur utilisé. Cette augmentation atteint, dans les deux lignées cellulaires, des niveaux comparables à ceux observés avec le DMSO seul, suggérant une activité pro-proliférative du SKI-5C, surpassant la toxicité de son solvant. En revanche, lors du traitement au FTY720, une diminution progressive de la quantité d'ADN cellulaire est mis en évidence avec une forte diminution entre 1 et 5  $\mu$ M. Cette observation souligne un effet anti-prolifératif de la part du FTY720.



**Figure 16. Effet des inhibiteurs SKI-5C et FTY720 sur la prolifération cellulaire mesurée par le test CyQUANT.**

En haut : cinétique de prolifération des cellules hESC et 12z traitées avec véhicule du SKI-5C (méthyl-acétate) ou du FTY720 (DMSO), à 20  $\mu$ M, mesurées à 24, 48 et 72 heures. En bas : effet dose-dépendant des inhibiteurs (0,1 à 20  $\mu$ M) sur la concentration d'ADN cellulaire (ng/ml) dans la lignée hESC (à gauche) et 12z (à droite), après 48 heures de traitement.

## 5. Impact sur la migration cellulaire (Scratch Wound Assay)

### 5.1. Effets dose-dépendants des inhibiteurs sur la migration cellulaire

Le *scratch wound assay* est une méthode standard permettant d'évaluer la migration cellulaire, réalisée en créant une brèche au milieu des puits contenant les cellules afin de pouvoir observer et quantifier le repeuplement de la brèche au cours du temps. Les cellules 12z et hESC ont été traitées avec différentes concentrations d'inhibiteurs (SKI-5C et FTY720 ; de 0,1 à 10 $\mu$ M), ensuite, pendant 48 heures, une mesure de la confluence a été effectuée toutes les 6 heures accompagnée d'une série de photos en microscopie à contraste de phase (grossissement 10x). La **figure 17** présente plusieurs images représentatives du traitement au FTY720. Seules les concentrations de 0,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M et 10  $\mu$ M ont été illustrées dans ce mémoire : en dessous de 0,5  $\mu$ M, aucun effet notable n'est observé par rapport à la condition contrôle, tandis qu'au-delà de 10  $\mu$ M, le traitement entraîne la mort cellulaire.

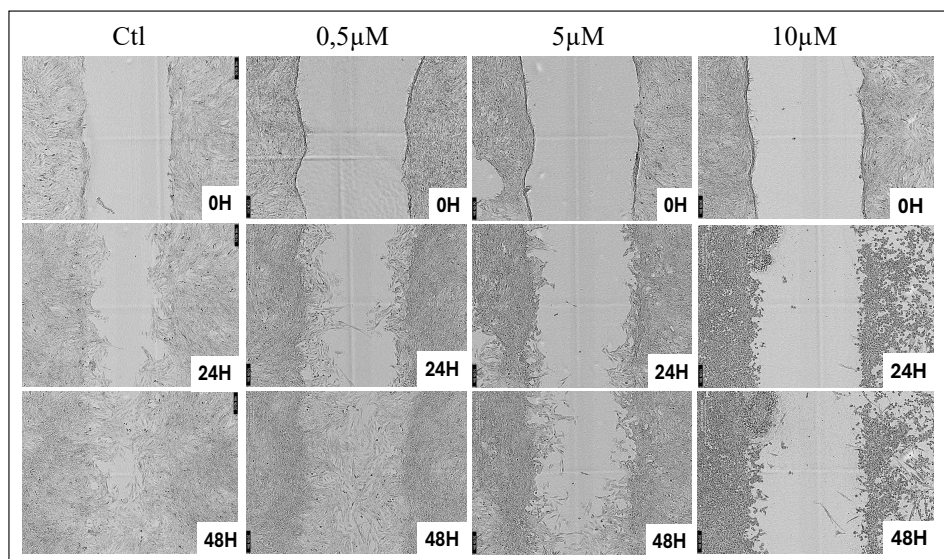
La fermeture de la brèche est ralentie lors du traitement au FTY720 dans les deux lignées cellulaires (**Fig. 18.A-C**). Cet effet est d'autant plus marqué chez les hESC (**Fig. 18.A**) au sein desquelles la confluence cellulaire atteint seulement 33,4% lors du traitement avec 10 $\mu$ M contre 64,8% dans la condition contrôle après 48h. Cependant, une dose de 10 $\mu$ M de FTY720 semble avoir un effet toxique causant la mort cellulaire, une observation confirmée visuellement par l'analyse microscopique de la fermeture des brèches (**Fig. 17**). En revanche, le SKI-5C n'induit pas de modifications significatives de la confluence cellulaire, quelle que soit la concentration testée (**Fig. 18.B-D**).

### 5.2. Modulation de l'expression de TIMP2 et uPA après traitement

Afin d'explorer les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'effet du FTY720 et du SKI-5C sur la migration, l'expression de TIMP2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2) et de uPA (urokinase activatrice du plasminogène) ont été analysées. TIMP2 est une protéine impliquée dans le remodelage de la matrice extra-cellulaire via l'inhibition de l'activité des métalloprotéinases, son expression indique une inhibition du potentiel migratoire. Tandis que uPA est une sérine-protéase qui clive le plasminogène en plasmine, enzyme responsable de la dégradation de la matrice extracellulaire, facilitant ainsi la migration. Les expressions de ces deux enzymes ont été analysées dans chaque lignée cellulaire (hESC et 12z) par RT-qPCR, après 6 heures de traitement avec les inhibiteurs.

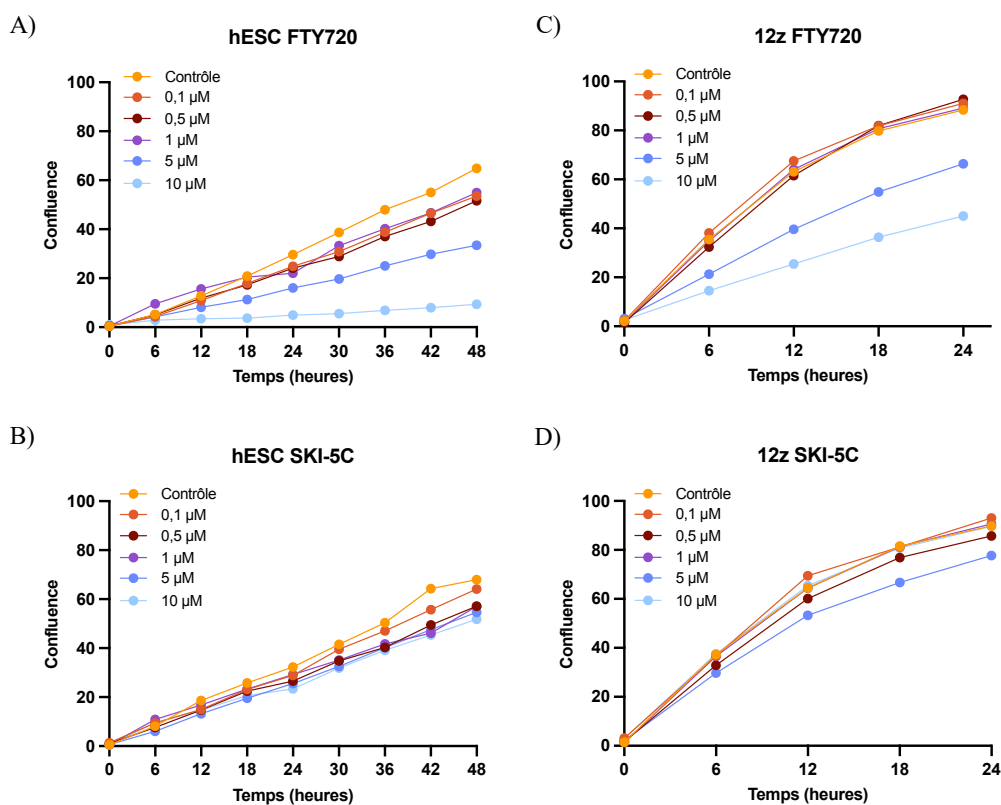
Dans la lignée hESC, des modulations non significatives sont observées, le traitement au SKI-5C induit une diminution de l'expression de l'ARNm de TIMP2 par rapport à la condition contrôle, tandis que le traitement au FTY720 entraîne une augmentation de cette expression. Aucun effet dose-dépendant n'est observable (**Fig. 19.A**). L'expression de uPA dans cette même lignée cellulaire ne montre aucune modulation, à l'exception du traitement à 10 $\mu$ M de SKI-5C, qui l'augmente de manière non significative par rapport à la condition contrôle (**Fig. 19.C**)

Dans la lignée 12z, les niveaux restent globalement constants entre les conditions (**Fig. 19.B-D**).



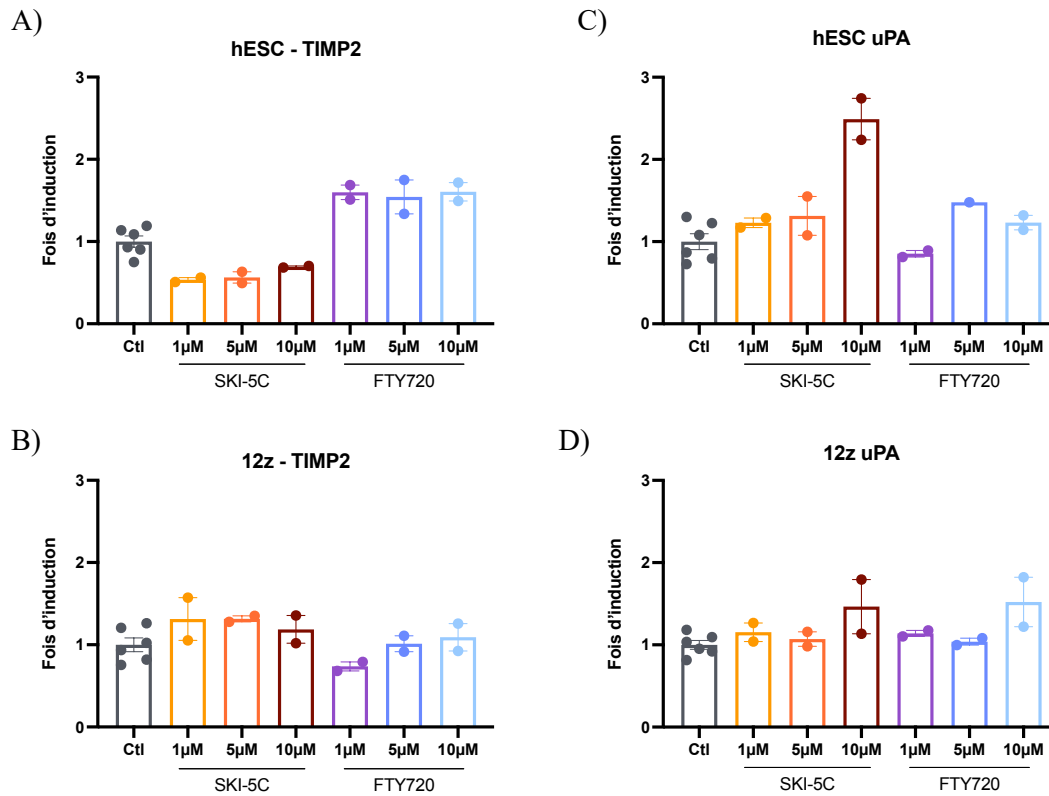
**Figure 17. Représentation visuelle de la fermeture de brèche dans des cellules hESC traitées avec du FTY720**

Images au microscope à contraste de phase, représentant l'évolution de la confluence des cellules hESC, du temps 0 jusqu'à 48 heures après la création de la brèche. La première condition contrôle correspond aux cellules traitées au DMSO (véhicule du FTY720). Ensuite, de gauche à droite, les cellules hESC ont été traitées avec une concentration croissante de FTY720 (de 0,5µM à 10µM).



**Figure 18. Effet dose-dépendant des inhibiteurs sur la migration cellulaire évaluée par un scratch wound assay.**

Représentation graphique de la confluence des cellules stromales hESC (A-C) et épithéliales 12z (B-D) par rapport au temps. Cinq concentrations différentes d'inhibiteurs y sont représentées (0,1µM, 0,5µM, 1µM, 5µM et 10µM), la condition contrôle présente dans chaque graphique correspond au traitement avec le véhicule du fingolimod (DMSO) ou du SKI-5C (méthyl-acétate).



**Figure 19. Expression génique de TIMP2 et uPA après traitement**

ARNm du gène TIMP2 (A, B) (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2) et uPA (C, D) (urokinase activatrice du plasminogène) mesurés par RT-qPCR dans les deux lignées cellulaires (hESC ; 12z ). Les résultats ont été analysés en suivant la méthode  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , normalisés par rapport aux gènes ubiquitaires GAPDH et B2M. Les données sont exprimées en « fois d'induction » par rapport à la condition contrôle. Les barres représentent la moyenne  $\pm$  SEM, pour deux réplicats biologiques (N=2). Une analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA1, aucun résultat significatif détecté.

---

---

# **Discussion et perspectives**

---

---

---

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

A l'heure actuelle, aucune recommandation thérapeutique consensuelle n'a été établie pour la prise en charge de l'adénomyose. Les traitements disponibles, qu'ils soient médicamenteux ou non, visent essentiellement à soulager les symptômes sans modifier l'évolution de la maladie. Récemment, la voie du sphingosine-1-phosphate (S1P) a suscité un intérêt croissant dans le contexte de l'endométriose, une pathologie fréquemment associée à l'adénomyose. Plusieurs études ont mis en évidence une accumulation de S1P dans les lésions endométriotiques comparativement aux tissus utérins sains.<sup>74,75</sup> La fréquente concomitance des deux pathologies et la similarité de certains mécanismes physiopathologiques suggèrent que la voie S1P pourrait également jouer un rôle dans l'adénomyose, bien qu'elle reste encore très peu explorée.<sup>76</sup>

Dans cette perspective, nous avons évalué deux inhibiteurs de la voie du S1P, le FTY720 et le SKI-5C, dans un modèle murin d'adénomyose. Deux fenêtres d'administration ont été testées : une intervention précoce et une tardive. Ce choix expérimental visait à apprécier l'efficacité des composés à différents stades de développement de la pathologie, en modulant le délai entre l'induction de l'adénomyose et le début du traitement.

Les analyses histologiques ont montré que l'administration précoce de FTY720 réduit significativement la proportion de coupes comportant des lésions, diminue l'aire occupée par les glandes ectopiques et limite leur infiltration dans le myomètre. En revanche, lorsqu'il est initié à un stade avancé, le FTY720 perd ses effets protecteurs.

Ce constat soulève la question cruciale de la fenêtre thérapeutique optimale pour cet inhibiteur. Le FTY720 agit comme agoniste-modulateur non sélectif des récepteurs S1PRs, avec une action prédominante via S1PR1, principalement exprimé à la surface des cellules immunitaires. Il est donc plausible que son efficacité soit limitée à la phase inflammatoire initiale, lorsque le recrutement et l'activation des cellules immunitaires jouent un rôle central dans la progression des lésions. Une fois les remaniements tissulaires établis, notamment la fibrose et la néoangiogenèse, l'inhibition de la voie S1P ne semble plus suffisante pour inverser les altérations architecturales de l'utérus.

Cette hypothèse est appuyée par les travaux de *Shen et al.*<sup>77</sup> qui ont montré que le remodelage fibrotique de l'utérus dans un modèle murin d'adénomyose se déroule principalement entre la 6<sup>e</sup> et la 9<sup>e</sup> semaine après induction. Ce timing coïncide avec l'efficacité observée du FTY720 dans la fenêtre d'administration précoce, avant l'installation définitive des altérations structurales. De manière complémentaire, une étude de *Gendron et al.*<sup>78</sup>, menée sur un modèle de lésions pulmonaires, démontre

également que le FTY720 est inefficace lorsqu'il est administré après l'initiation des processus de remodelage tissulaire, ce qui renforce l'idée que son efficacité dépend étroitement du stade d'évolution des lésions

A l'inverse, le SKI-5C s'est révélé efficace dans le protocole d'administration tardive, entraînant une réduction significative des lésions. Cet inhibiteur cible directement la kinase SPHK1, enzyme clé de la production cytosolique du S1P, et en diminue ainsi la synthèse à la source. En réduisant la disponibilité du ligand pour tous les récepteurs S1PR, le SKI-5C induit une inhibition plus étendue et soutenue de la voie, ce qui pourrait expliquer son efficacité à un stade plus avancé de la pathologie. Toutefois, le SKI-5C n'ayant pas été évalué dans un protocole d'administration précoce, il reste difficile de comparer pleinement son efficacité à celle du FTY720. Des études complémentaires, incluant des tests à différentes fenêtres temporelles et doses croissantes, seraient nécessaires pour mieux caractériser leur potentiel thérapeutique respectif.

Sur le plan moléculaire, les analyses RT-qPCR réalisées pour évaluer l'expression de gènes associés à l'inflammation, à la fibrose et à la transition épithélio-mésenchymateuse, ont révélé un profil d'expression globalement inverse à celui attendu. Hormis l'urokinase uPA, la majorité des gènes étudiés présentaient une expression plus faible dans les groupes adénomyose par rapport aux témoins. Ce constat contraste avec les données publiées par *Green et al.*<sup>79</sup>, *Jin et al.*<sup>80</sup> et *Bourdon et al.*<sup>81</sup>, qui rapportent au contraire une surexpression de ces marqueurs dans des modèles murins d'adénomyose. De manière intéressante, les cytokines IL6 et IL10 montrent de façon significative des profils inattendus. L'IL6, une cytokine pro-inflammatoire, reste élevée après traitement avec les inhibiteurs à des niveaux comparables à ceux observés dans le groupe d'adénomyose, suggérant une persistance de l'état inflammatoire malgré l'intervention. L'IL10, connue pour son rôle anti-inflammatoire, apparaît significativement plus exprimée dans les tissus adénomyosiques que dans les tissus témoins, des résultats déjà observés dans l'adénomyose par *Wang et al.*<sup>82</sup>, évoquant un mécanisme compensatoire ou une réponse adaptative propre au microenvironnement de la pathologie.

Plusieurs explications sont envisageables : d'une part, le choix restreint de gènes, ciblant des processus biologiques complexes, peut s'avérer insuffisant pour refléter fidèlement l'ensemble des dérégulations transcriptomiques impliquées. D'autre part, les contraintes temporelles liées au projet ont limité la profondeur de l'analyse. Ces éléments suggèrent que les gènes sélectionnés ne constituent peut-être pas les marqueurs les plus pertinents pour caractériser les mécanismes actifs dans notre modèle.

Une possible hypothèse pour expliquer cette divergence de résultats réside dans l'importance du temps pour le développement de la pathologie. En effet, dans les études citées ci-dessus, *Green et al.* ont montré que l'expression de TGF $\beta$  et de CollA1 deviennent significativement plus élevée à 12 semaines post-

induction, tandis que notre groupe murin le plus âgé n'avait que 9 semaines au moment des analyses. Il est donc envisageable que les marqueurs étudiés n'aient pas encore atteint leur pic d'expression à ce stade. D'autre part, nos analyses transcriptomiques ont été réalisées sur des échantillons utérins entiers, sans microdissection préalable des foyers adénomyosiques. Ce choix méthodologique a probablement dilué le signal spécifique des régions lésées dans une signature globale, rendant les différences plus difficiles à détecter. L'utilisation de souris plus âgées, chez lesquelles la proportion de tissu atteint est plus importante, aurait pu améliorer la détection des altérations moléculaires à l'échelle tissulaire.

En revanche, l'urokinase uPA apparaît comme un marqueur plus informatif dans notre modèle. Son expression, significativement augmentée dans les groupes d'adénomyoses, puis régulée à la baisse après traitement, suggère une implication dans le développement des lésions. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Kobayashi <sup>83</sup> qui a montré que des cellules ectopiques issues de patientes atteintes d'adénomyose, surexpriment la protéine uPA jusqu'à 12 fois plus que dans les cellules eutopiques, renforçant l'hypothèse d'une implication de cette protéine dans l'acquisition du phénotype invasif des cellules endométriales.

Il est également important de rappeler que les analyses d'expression génique par RT-qPCR ne permettent pas de tenir compte des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle, ni des modifications post-traductionnelles susceptibles d'affecter l'abondance protéique. Une validation au niveau protéique (par Western blot ou ELISA), idéalement réalisée sur des tissus lésionnels microdisséqués, serait donc indispensable pour confirmer les résultats obtenus. Toutefois, la nature diffuse des foyers lésionnels et le faible volume utérin chez la souris représentent des limites techniques majeures à ce type d'approche. En complément, une coloration histologique par trichrome de Masson sur coupes utérines permettrait de visualiser directement la fibrose en révélant l'accumulation de fibres de collagène au sein des lésions, validant ainsi l'existence d'un processus fibrotique localisé. Enfin, un suivi longitudinal élargi (par exemple de 2 à 20 semaines post-induction de l'adénomyose) combiné à une modulation des doses administrées, permettrait de mieux caractériser la dynamique moléculaire de la pathologie et d'optimiser la fenêtre thérapeutique des inhibiteurs testés.

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets observés *in vivo* des inhibiteurs de la voie du S1P, nous avons mené une série d'expériences *in vitro* sur deux lignées cellulaires humaines immortalisées : les cellules endométriales stromales (hESC) et épithéliales (12z). Ce choix nous a permis de modéliser de manière séparée deux populations cellulaires majeures de l'endomètre, toutes deux impliquées dans la physiopathologie de l'adénomyose. Les cellules hESC représentent le compartiment stromal, impliqué dans la production de matrice extracellulaire et les interactions paracrines, tandis que les cellules 12z épithéliales reflètent l'activité proliférative de l'épithélium glandulaire.

Dans un premier temps, nous avons analysé la cinétique de la réponse transcriptionnelle à une stimulation par le S1P (100nM), à deux points temporels (6h et 24h), avec l'objectif de mimer une accumulation locale de S1P au sein de l'endomètre pathologique.

De manière intéressante, aucune modulation significative de l'expression des principaux gènes impliqués dans la voie du S1P n'a été observée dans les cellules stromales hESC après stimulation. Ce résultat suggère que, dans ces cellules, le métabolisme du S1P est probablement déjà régulé de manière optimale en conditions basales. Cette hypothèse est soutenue par les travaux de *Brünnert et al.*<sup>84</sup>, qui ont rapporté une expression constitutive élevée des enzymes impliquées dans la synthèse (SPHKs) et la dégradation (SGPPs, SGPL1) du S1P dans les cellules stromales endométriales humaines, indépendamment d'une stimulation exogène.

En revanche, les cellules épithéliales 12z ont présenté une réponse transcriptionnelle transitoire au traitement par le S1P, caractérisée par une augmentation de SPHK1 et de SGPP2 à 6 heures, suivie d'un retour aux niveaux basaux à 24 heures. Une élévation similaire de l'expression de S1PR3 a également été observée, en accord avec les résultats de *Vannuzzi et al.*<sup>85</sup>, qui avaient identifié la surexpression de ce récepteur dans des échantillons d'adénomyose. En revanche, nous n'avons pas confirmé la surexpression de S1PR4 et S1PR5 rapportée dans cette même étude. Ces divergences peuvent s'expliquer par la différence de modèle expérimental : de *Vannuzzi et al.*<sup>85</sup> ont mené leur analyse *in vivo*, tandis que nos données proviennent de cultures cellulaires monoclonales *in vitro*, dépourvues des interactions cellulaires et du microenvironnement complexe de l'utérus.

L'augmentation de SPHK1 pourrait résulter de l'amplification de l'expression de TNF $\alpha$  en réponse au S1P, induisant la translocation membranaire de SPHK1 et stimulant la production de S1P cytosolique.<sup>86</sup> En réponse, l'activation de SGPP2 agirait comme un mécanisme homéostatique pour limiter l'accumulation de S1P dans le cytosol. L'absence de modulation de S1PR4 et S1PR5 pourrait refléter une désensibilisation des récepteurs peu actifs ou une régulation négative visant à éviter une activation excessive de la voie.

Enfin, l'ensemble des variations d'expression observées au sein des deux lignées suivent un profil transitoire : une modulation marquée à 6 heures, suivie d'un retour à des niveaux comparables à ceux des témoins à 24 heures. Cette dynamique suggère une réponse rapide mais de courte durée au S1P, probablement liée à l'épuisement du S1P exogène par consommation ou dégradation, en particulier via l'induction de SGPP2, ainsi qu'à la mise en place de boucles de rétrocontrôle inhibiteur. Ces observations indiquent que l'homéostasie transcriptionnelle est rétablie dans un délai de 24 heures.

Afin d'explorer si ces modulations moléculaires sont associées aux effets observés *in vivo*, nous avons évalué l'impact des deux inhibiteurs sur deux processus cellulaires clés impliqués dans la progression de l'adénomyose : la prolifération et la migration cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé un test CyQUANT pour quantifier la prolifération cellulaire, ainsi qu'un « scratch wound assay » pour analyser la migration, sur les deux lignées cellulaires (hESC et 12z) précédemment caractérisées.

Le FTY720 a confirmé un effet anti-prolifératif et anti-migratoire dans les deux modèles cellulaires testés, ce qui corrobore à la fois nos résultats *in vivo* et les données rapportées dans la littérature sur d'autres types cellulaires.<sup>87,88</sup> Toutefois, ces effets doivent être interprétés avec prudence : à des concentrations élevées, le FTY720 devient cytotoxique. Lors du « scratch wound assay », nous avons observé qu'à 10µM, les cellules présentaient une altération marquée de leur intégrité membranaire dès 24 heures, avec un aspect « éclaté » au microscope, évocateur de cytolysse. Cette toxicité est en accord avec les résultats de *Böhler et al.*<sup>89</sup> qui ont montré qu'une dose équivalente induisait l'apoptose cellulaire après 48 heures d'incubation. Il devient donc difficile, à ces concentrations, de distinguer un véritable effet cytostatique d'une perte de viabilité cellulaire, ce qui souligne l'importance de définir une fenêtre thérapeutique optimale.

Le SKI-5C, en revanche, s'est révélé paradoxalement pro-prolifératif et associé à une absence d'inhibition de la migration *in vitro*, en contradiction avec son activité anti-lésionnelle observée *in vivo*. Deux hypothèses distinctes peuvent être avancées pour expliquer cette discordance. D'une part, en inhibant SPHK1, le SKI-5C bloque la synthèse de S1P mais pourrait conduire à une accumulation de céramide-1-phosphate (C1P), un lipide connu pour stimuler la prolifération et la migration via l'activation de la cascade PLC $\alpha$ /PKC $\alpha$  et déclencher les voies PI3K/Akt et MEK/ERK.<sup>90</sup> D'autre part, la réduction du pool cytosolique de S1P pourrait entraîner une suractivation compensatoire de SPHK2, une kinase localisée dans le noyau, dont le produit d'activité, le S1P nucléaire, agit comme cofacteur transcriptionnel pour des gènes promoteurs de la prolifération cellulaire.<sup>91</sup> Ces deux mécanismes pourraient expliquer les effets observés. Pour les valider, des expérimentations complémentaires sont nécessaires, telles que des dosages lipidiques par LC-MS/MS pour mesurer les niveaux de C1P, ainsi que des Western blot ciblant les formes phosphorylées de PLC $\alpha$ , PKC $\alpha$ , Akt et ERK1/2 après différentes durées de traitement au SKI-5C. En outre, l'ajout de C1P exogène dans le milieu de culture de cellules non traitées pourrait permettre de valider son activité pro-migratoire et pro-invasive.

Un facteur confondant potentiel dans l'interprétation des résultats réside dans le choix du solvant utilisé pour solubiliser les inhibiteurs. Le SKI-5C est dissous dans du méthyl-acétate (MeOAc), tandis que le FTY720 est préparé dans du DMSO. Nos résultats montrent que le MeOAc, administré seul, diminue significativement la prolifération cellulaire, ce qui suggère un effet cytostatique, voire une légère cytotoxicité *in vitro*. Toutefois, dans les conditions testées, l'effet pro-prolifératif du SKI-5C semble partiellement contrebalancer cet impact négatif. Il est important de souligner que le MeOAc est

rapidement hydrolysé *in vivo* en méthanol et en acide acétique, ce qui limite sa toxicité aiguë à faible dose.<sup>92</sup> Néanmoins, cette différence de véhicule constitue une variable expérimentale non négligeable, à considérer dans l'interprétation comparative des effets *in vitro* et *in vivo* des deux composés.

Il est également essentiel de garder à l'esprit les limites intrinsèques des cultures monocellulaires *in vitro*. En isolant un seul type cellulaire, ces modèles excluent ainsi les interactions bidirectionnelles avec le microenvironnement tissulaire. Or, dans l'utérus, les cellules stromales et épithéliales interagissent étroitement avec les cellules immunitaires et endothéliales, notamment via des signaux paracrines, régulant des processus clés comme la prolifération, la migration ou encore la fibrose. De plus, ces modèles de monocultures ne reproduisent ni la structure tridimensionnelle de la matrice extracellulaire ni les contraintes mécaniques présentes *in vivo*, éléments pourtant déterminants pour la polarité cellulaire et la transduction des signaux. Ils ne tiennent pas compte non plus des gradients de concentrations de métabolites ou de lipides, qui influencent fortement les réponses biologiques. Enfin, l'absence du métabolisme tissulaire et de vascularisation empêche de reproduire fidèlement les profils pharmacocinétiques des inhibiteurs testés, notamment en ce qui concerne leur biodisponibilité, leur demi-vie et leur métabolisme. Ces éléments limitent la transposabilité des résultats *in vitro* à des situations physiopathologiques complexes *in vivo*.

En résumé, nos données *in vivo* montrent que le FTY720 diminue significativement l'infiltration et le développement des lésions adénomyosiques au sein du myomètre lorsqu'il est administré précocement. *In vitro*, ce même composé induit un effet anti-prolifératif et anti-migratoire marqué à partir de 1µM. Cette concordance suggère qu'une partie de l'effet protecteur observé sur le modèle murin, résulte d'une action directe sur les cellules utérines épithéliales et stromales, en complément de son effet bien connu de séquestration lymphocytaire.

A l'inverse, bien que le SKI-5C réduise *in vivo* l'étendue des lésions établies, il ne montre pas d'effet sur la migration et stimule la prolifération *in vitro*. Ce décalage souligne l'importance du microenvironnement tissulaire dans la modulation des effets pharmacologiques, et met en évidence les limites des cultures monocellulaires. L'intégration d'interactions cellulaires, de signaux mécaniques et de gradients de facteurs diffusibles, absents en monoculture, semble essentielle pour appréhender pleinement la réponse aux inhibiteurs de la voie du S1P.

Par ailleurs, nos résultats *in vitro* montrent que les deux inhibiteurs modulent l'expression de régulateurs clés du remodelage de la matrice extracellulaire dans les cellules endométriales stromales. Le FTY720 induit une augmentation tendancielle de l'expression de TIMP2, un inhibiteur des métalloprotéinases, suggérant un rôle potentiel, bien que non significatif, dans la limitation de la dégradation de la matrice extracellulaire et donc de l'invasion cellulaire. A l'inverse, le SKI-5C augmente l'expression de l'uPA à de fortes concentrations, favorisant la conversion du plasminogène en plasmine, et par conséquent la

dégradation de la matrice extracellulaire. Cette opposition dans les effets observés renforce l'idée que, *in vitro*, la voie SIP joue un rôle direct dans l'équilibre protéolytique du microenvironnement cellulaire. Toutefois, *in vivo*, cette régulation est probablement modulée par l'ensemble des interactions cellulaires et tissulaires, qui atténuent ou amplifient les effets des inhibiteurs selon le contexte.

En conclusion, ce travail constitue une première contribution à l'exploration du rôle de la voie du SIP dans l'adénomyose. Bien que l'efficacité thérapeutique des deux inhibiteurs testés ne puisse être affirmée de manière définitive, nos résultats suggèrent que le FTY720 présente une activité protectrice contre le développement des lésions lorsqu'il est administré précocement, tandis que le SKI-5C conserve une activité à un stade plus avancé, malgré un profil pro-prolifératif paradoxal observé *in vitro*.

Cette étude ouvre plusieurs perspectives de recherche. Il sera notamment essentiel de confirmer l'accumulation locale de SIP dans les lésions adénomyosiques, notamment par des analyses lipidiques ciblées (LC-MS/MS), et de compléter les données transcriptomiques par des dosages protéiques ciblés sur des tissus microdisséqués. L'élargissement des fenêtres d'analyse *in vivo* (de 2 à 20 semaines post-induction), ainsi qu'une évaluation de la relation dose-réponse des inhibiteurs, permettront d'optimiser la stratégie thérapeutique en fonction du stade évolutif de la maladie.

Enfin, la mise en place de modèles cellulaires plus représentatifs de l'environnement utérin, tels que des co-cultures épithélio-stromales ou des organoïdes utérins intégrant la matrice extracellulaire et les composantes immunitaires, sera indispensable pour mieux évaluer les effets pharmacologiques dans un environnement proche de la physiologie utérine.

En reliant les effets moléculaires à des résultats fonctionnels *in vivo*, ce mémoire propose une stratégie innovante dans l'adénomyose, qui mérite désormais d'être approfondie par des investigations mécanistiques et précliniques complémentaires.

---

---

# **Références bibliographiques**

---

---

---

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. Chen, Y. *et al.* Oestrogen-induced epithelial–mesenchymal transition of endometrial epithelial cells contributes to the development of adenomyosis. *The Journal of Pathology* **222**, 261–270 (2010).
2. Bird, C. C., McElin, T. W. & Manalo-Estrella, P. The elusive adenomyosis of the uterus—revisited. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **112**, 583–593 (1972).
3. Peric, H. & Fraser, I. S. The symptomatology of adenomyosis. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **20**, 547–555 (2006).
4. Mishra, I. *et al.* P-330 The impact of adenomyosis on pregnancy outcomes, from conception to birth- a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction* **39**, deae108.694 (2024).
5. Vercellini, P. *et al.* Uterine adenomyosis and in vitro fertilization outcome: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction* **29**, 964–977 (2014).
6. Arlier, S. *et al.* The impact of adenomyosis on intrauterine insemination success in unexplained infertile women: a retrospective cross-sectional study. *BMC Pregnancy Childbirth* **25**, 650 (2025).
7. Ameer, M. A., Fagan, S. E., Sosa-Stanley, J. N. & Peterson, D. C. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Uterus. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2025).
8. Yamaguchi, M. *et al.* Three-dimensional understanding of the morphological complexity of the human uterine endometrium. *iScience* **24**, 102258 (2021).
9. Brosens, J. J., De Souza, N. M. & Barker, F. G. Uterine junctional zone: function and disease. *The Lancet* **346**, 558–560 (1995).
10. McCarthy, S. *et al.* Uterine junctional zone: MR study of water content and relaxation properties. *Radiology* **171**, 241–243 (1989).
11. De Vries, K., Lyons, E. A., Ballard, G., Levi, C. S. & Lindsay, D. J. Contractions of the inner third of the myometrium. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **162**, 679–682 (1990).
12. Zingg, H. H. *et al.* Oxytocin and Oxytocin Receptor Gene Expression in the Uterus. in *Proceedings of the 1993 Laurentian Hormone Conference* 255–273 (Elsevier, 1995). doi:10.1016/B978-0-12-571150-0.50015-9.

13. Boyd, K. L., Muehlenbachs, A., Rendi, M. H., Garcia, R. L. & Gibson-Corley, K. N. 17 - Female Reproductive System. in *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)* (eds. Treuting, P. M., Dintzis, S. M. & Montine, K. S.) 303–334 (Academic Press, San Diego, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-802900-8.00017-8.
14. Anatomy and Histology of the Normal Rodent Uterus.
15. Artymuk, N., Zotova, O. & Gulyaeva, L. Adenomyosis: genetics of estrogen metabolism. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* **37**, 20180069 (2019).
16. Leyendecker, G., Wildt, L. & Mall, G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. *Arch Gynecol Obstet* **280**, 529–538 (2009).
17. Guo, S.-W. The Pathogenesis of Adenomyosis vis-à-vis Endometriosis. *JCM* **9**, 485 (2020).
18. Schwab, K. E., Chan, R. W. S. & Gargett, C. E. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertility and Sterility* **84**, 1124–1130 (2005).
19. Ferenczy, A. Pathophysiology of adenomyosis. *Human Reproduction Update* **4**, 312–322 (1998).
20. Gargett, C. E. Uterine stem cells: What is the evidence? *Human Reproduction Update* **13**, 87–101 (2007).
21. García-Solares, J., Donnez, J., Donnez, O. & Dolmans, M.-M. Pathogenesis of uterine adenomyosis: invagination or metaplasia? *Fertility and Sterility* **109**, 371–379 (2018).
22. Cousins, F. L., O, D. F. & Gargett, C. E. Endometrial stem/progenitor cells and their role in the pathogenesis of endometriosis. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **50**, 27–38 (2018).
23. Zhai, J., Vannuccini, S., Petraglia, F. & Giudice, L. C. Adenomyosis: Mechanisms and Pathogenesis. *Semin Reprod Med* **38**, 129–143 (2020).
24. Smolarz, B., Szyłło, K. & Romanowicz, H. Endometriosis: Epidemiology, Classification, Pathogenesis, Treatment and Genetics (Review of Literature). *IJMS* **22**, 10554 (2021).
25. Chen, Y. *et al.* Oestrogen-induced epithelial–mesenchymal transition of endometrial epithelial cells contributes to the development of adenomyosis. *The Journal of Pathology* **222**, 261–270 (2010).

26. Tremellen, K. P. & Russell, P. The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure. II: adenomyosis and macrophages. *Journal of Reproductive Immunology* **93**, 58–63 (2012).
27. Shi, J., Xu, Q., Yu, S. & Zhang, T. Perturbations of the endometrial immune microenvironment in endometriosis and adenomyosis: their impact on reproduction and pregnancy. *Semin Immunopathol* **47**, 16 (2025).
28. Andres, M. P. *et al.* Transvaginal Ultrasound for the Diagnosis of Adenomyosis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Minimally Invasive Gynecology* **25**, 257–264 (2018).
29. Dashottar, S. *et al.* Comparative analysis of changes in MR imaging of pre and post intrauterine progesterone implants in adenomyosis cases. *Medical Journal Armed Forces India* **71**, 145–151 (2015).
30. Goldstuck, N. D. The levonorgestrel-releasing intrauterine system 52 mg as a contraceptive versus a therapeutic: essential differences and perspectives. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care* **28**, 177–183 (2023).
31. Lee, K. H. *et al.* Relationship between uterine volume and discontinuation of treatment with levonorgestrel-releasing intrauterine devices in patients with adenomyosis. *Arch Gynecol Obstet* **294**, 561–566 (2016).
32. Neriishi, K. *et al.* Long-term dienogest administration in patients with symptomatic adenomyosis. *J of Obstet and Gynaecol* **44**, 1439–1444 (2018).
33. Shaaban, O. M., Ali, M. K., Sabra, A. M. A. & Abd El Aal, D. E. M. Levonorgestrel-releasing intrauterine system versus a low-dose combined oral contraceptive for treatment of adenomyotic uteri: a randomized clinical trial. *Contraception* **92**, 301–307 (2015).
34. Etrusco, A. *et al.* Current Medical Therapy for Adenomyosis: From Bench to Bedside. *Drugs* **83**, 1595–1611 (2023).
35. Fedele, L., Bianchi, S. & Frontino, G. Hormonal treatments for adenomyosis. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **22**, 333–339 (2008).
36. Owen, P. R. Prostaglandin synthetase inhibitors in the treatment of primary dysmenorrhea. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **148**, 96–103 (1984).

37. De Bruijn, A. M. *et al.* Uterine Artery Embolization for the Treatment of Adenomyosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* **28**, 1629-1642.e1 (2017).
38. Bratby, M. J. & Walker, W. J. Uterine artery embolisation for symptomatic adenomyosis—Mid-term results. *European Journal of Radiology* **70**, 128–132 (2009).
39. Shui, L. *et al.* High-intensity focused ultrasound (HIFU) for adenomyosis: Two-year follow-up results. *Ultrasonics Sonochemistry* **27**, 677–681 (2015).
40. Younes, G. & Tulandi, T. Conservative Surgery for Adenomyosis and Results: A Systematic Review. *Journal of Minimally Invasive Gynecology* **25**, 265–276 (2018).
41. Capezzuoli, T. *et al.* Conservative surgical treatment for adenomyosis: New options for looking beyond uterus removal. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **95**, 102507 (2024).
42. Chrobak, A. *et al.* Ectopic and eutopic stromal endometriotic cells have a damaged ceramide signaling pathway to apoptosis. *Fertility and Sterility* **92**, 1834–1843 (2009).
43. Vannuzzi, V. *et al.* Sphingosine 1-phosphate pathway is dysregulated in adenomyosis. *Reproductive BioMedicine Online* **45**, 15–18 (2022).
44. Proia, R. L. & Hla, T. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *J. Clin. Invest.* **125**, 1379–1387 (2015).
45. Le Stunff, H. *et al.* Recycling of Sphingosine Is Regulated by the Concerted Actions of Sphingosine-1-phosphate Phosphohydrolase 1 and Sphingosine Kinase 2. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 34372–34380 (2007).
46. Pyne, S., Kong, K.-C. & Darroch, P. I. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: the role of lipid phosphate phosphatases. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **15**, 491–501 (2004).
47. Bektas, M. *et al.* Sphingosine 1-Phosphate Lyase Deficiency Disrupts Lipid Homeostasis in Liver. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 10880–10889 (2010).
48. Fukuhara, S. *et al.* The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 1416–1426 (2012).

49. Hu, Y. & Dai, K. Sphingosine 1-Phosphate Metabolism and Signaling. in *Sphingolipid Metabolism and Metabolic Disease* (ed. Jiang, X.-C.) vol. 1372 67–76 (Springer Nature Singapore, Singapore, 2022).
50. Christoffersen, C. *et al.* Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 9613–9618 (2011).
51. Bréart, B. *et al.* Lipid phosphate phosphatase 3 enables efficient thymic egress. *Journal of Experimental Medicine* **208**, 1267–1278 (2011).
52. Allende, M. L., Yamashita, T. & Proia, R. L. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood* **102**, 3665–3667 (2003).
53. Blaho, V. A. & Hla, T. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *Journal of Lipid Research* **55**, 1596–1608 (2014).
54. Wang, S. *et al.* Sphingosine-1-Phosphate Receptor 4 Attenuates Neutrophilic Airway Inflammation in Experimental Asthma via Repressing Proinflammatory Macrophage Activation. *Int. J. Biol. Sci.* **19**, 1597–1615 (2023).
55. Evrard, M. *et al.* Sphingosine 1-phosphate receptor 5 (S1PR5) regulates the peripheral retention of tissue-resident lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* **219**, e20210116 (2022).
56. Mizugishi, K. *et al.* Essential Role for Sphingosine Kinases in Neural and Vascular Development. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 11113–11121 (2005).
57. Jozefczuk, E., Guzik, T. J. & Siedlinski, M. Significance of sphingosine-1-phosphate in cardiovascular physiology and pathology. *Pharmacological Research* **156**, 104793 (2020).
58. Keul, P. *et al.* Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Regulates Cardiac Function by Modulating Ca<sup>2+</sup> Sensitivity and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange and Mediates Protection by Ischemic Preconditioning. *JAHA* **5**, e003393 (2016).
59. Tilly, J. L. & Kolesnick, R. N. Sphingolipids, apoptosis, cancer treatments and the ovary: investigating a crime against female fertility. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1585**, 135–138 (2002).
60. Santulli, P. *et al.* Sphingosine pathway deregulation in endometriotic tissues. *Fertility and Sterility* **97**, 904-911.e5 (2012).

61. Yoshino, O. *et al.* Sphingosine 1 Phosphate (S1P) Increased IL-6 Expression and Cell Growth in Endometriotic Cells. *Reprod. Sci.* **26**, 1460–1467 (2019).
62. Al-Jarallah, A., Chen, X., González, L. & Trigatti, B. L. High Density Lipoprotein Stimulated Migration of Macrophages Depends on the Scavenger Receptor Class B, Type I, PDZK1 and Akt1 and Is Blocked by Sphingosine 1 Phosphate Receptor Antagonists. *PLoS ONE* **9**, e106487 (2014).
63. Bernacchioni, C. *et al.* Sphingosine 1-phosphate receptors are dysregulated in endometriosis: possible implication in transforming growth factor  $\beta$ -induced fibrosis. *Fertility and Sterility* **115**, 501–511 (2021).
64. Zhang, X., Ritter, J. K. & Li, N. Sphingosine-1-phosphate pathway in renal fibrosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **315**, F752–F756 (2018).
65. Huang, T. *et al.* Oestrogen-induced angiogenesis promotes adenomyosis by activating the S1P-VEGF axis in endometrial epithelial cells. *J Cellular Molecular Medi* **18**, 1358–1371 (2014).
66. Yang, L. *et al.* Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis is involved in liver fibrosis-associated angiogenesis. *Journal of Hepatology* **59**, 114–123 (2013).
67. Paik, J. H., Chae, S., Lee, M.-J., Thangada, S. & Hla, T. Sphingosine 1-Phosphate-induced Endothelial Cell Migration Requires the Expression of EDG-1 and EDG-3 Receptors and Rho-dependent Activation of  $\alpha v\beta 3$ - and  $\beta 1$ -containing Integrins. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 11830–11837 (2001).
68. Frémin, C. & Meloche, S. From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol* **3**, 8 (2010).
69. Mandala, S. *et al.* Alteration of Lymphocyte Trafficking by Sphingosine-1-Phosphate Receptor Agonists. *Science* **296**, 346–349 (2002).
70. Zhang, F. *et al.* Blocking sphingosine 1-phosphate receptor 1 with modulators reduces immune cells infiltration and alleviates endometriosis in mice. *Reproductive BioMedicine Online* **47**, 103304 (2023).
71. Rudzitis-Auth, J., Christoffel, A., Menger, M. D. & Laschke, M. W. Targeting sphingosine kinase-1 with the low MW inhibitor SKI-5C suppresses the development of endometriotic lesions in mice. *British J Pharmacology* **178**, 4104–4118 (2021).

72. Lin, P. *et al.* Reference Gene Selection for Real-Time Quantitative PCR Analysis of the Mouse Uterus in the Peri-Implantation Period. *PLoS ONE* **8**, e62462 (2013).
73. Green, A. R. *et al.* Neonatal tamoxifen treatment of mice leads to adenomyosis but not uterine cancer. *Experimental and Toxicologic Pathology* **56**, 255–263 (2005).
74. Ono, Y. *et al.* Sphingosine 1-Phosphate (S1P) in the Peritoneal Fluid Skews M2 Macrophage and Contributes to the Development of Endometriosis. *Biomedicines* **9**, 1519 (2021).
75. Yoshino, O. *et al.* Sphingosine I Phosphate (S1P) Increased IL-6 Expression and Cell Growth in Endometriotic Cells. *Reprod. Sci.* **26**, 1460–1467 (2019).
76. Bulun, S. E. *et al.* Endometriosis and adenomyosis: shared pathophysiology. *Fertility and Sterility* **119**, 746–750 (2023).
77. Shen, M., Liu, X., Zhang, H. & Guo, S.-W. Transforming growth factor  $\beta$ 1 signaling coincides with epithelial–mesenchymal transition and fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation in the development of adenomyosis in mice. *Hum. Reprod.* dev314 (2015) doi:10.1093/humrep/dev314.
78. Gendron, D. R. *et al.* FTY720 promotes pulmonary fibrosis when administered during the remodelling phase following a bleomycin-induced lung injury. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **44**, 50–56 (2017).
79. Green, A. R. *et al.* Neonatal tamoxifen treatment of mice leads to adenomyosis but not uterine cancer. *Experimental and Toxicologic Pathology* **56**, 255–263 (2005).
80. Jin, Z., Wu, X., Liu, H. & Xu, C. Celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, markedly reduced the severity of tamoxifen-induced adenomyosis in a murine model. *Exp Ther Med* (2020) doi:10.3892/etm.2020.8580.
81. Bourdon, M. *et al.* Immune cells and Notch1 signaling appear to drive the epithelial to mesenchymal transition in the development of adenomyosis in mice. *Molecular Human Reproduction* **27**, gaab053 (2021).
82. Wang, F. *et al.* Expression of interleukin-10 in patients with adenomyosis. *Fertility and Sterility* **91**, 1681–1685 (2009).
83. Kobayashi, H. Invasive Capacity of Heterotopic Endometrium. *Gynecol Obstet Invest* **50**, 26–32 (2000).

84. Brunnert, D. *et al.* Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate metabolic pathways and their receptors are differentially regulated during decidualization of human endometrial stromal cells. *Molecular Human Reproduction* **20**, 1016–1025 (2014).
85. Vannuzzi, V. *et al.* Sphingosine 1-phosphate pathway is dysregulated in adenomyosis. *Reproductive BioMedicine Online* **45**, 15–18 (2022).
86. Scherer, E. Q. *et al.* Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Enhances Microvascular Tone and Reduces Blood Flow in the Cochlea via Enhanced Sphingosine-1-Phosphate Signaling. *Stroke* **41**, 2618–2624 (2010).
87. Zhang, L., Wang, H., Zhu, J., Ding, K. & Xu, J. FTY720 reduces migration and invasion of human glioblastoma cell lines via inhibiting the PI3K/AKT/mTOR/p70S6K signaling pathway. *Tumor Biol.* **35**, 10707–10714 (2014).
88. Corbett, B. *et al.* FTY720 (Fingolimod), a modulator of sphingosine-1-phosphate receptors, increases baseline hypothalamic-pituitary adrenal axis activity and alters behaviors relevant to affect and anxiety. *Physiology & Behavior* **240**, 113556 (2021).
89. Böhler, T. *et al.* Effect of FTY720 on Apoptosis of Smooth Muscle Cells. *Transplantation Proceedings* **39**, 2624–2626 (2007).
90. Rivera, I.-G. *et al.* Ceramide 1-phosphate regulates cell migration and invasion of human pancreatic cancer cells. *Biochemical Pharmacology* **102**, 107–119 (2016).
91. Hait, N. C. *et al.* Regulation of Histone Acetylation in the Nucleus by Sphingosine-1-Phosphate. *Science* **325**, 1254–1257 (2009).
92. Wang, N. C. Y. Provisional Peer-Reviewed Toxicity Values for Methyl Acetate (CASRN 79-20-9).