



HAL
open science

Validation de modèles 3D de chordome et preuves de concept in vitro d'une stratégie radiosensibilisante

Marie-Anaïs Locquet

► **To cite this version:**

Marie-Anaïs Locquet. Validation de modèles 3D de chordome et preuves de concept in vitro d'une stratégie radiosensibilisante. Cancer. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1042 . tel-03714142

HAL Id: tel-03714142

<https://theses.hal.science/tel-03714142>

Submitted on 5 Jul 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2021LYSE1042

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie, Biologie, Santé

Discipline : Oncologie

Soutenue publiquement le 09/03/2021, par :

Marie-Anaïs Locquet

Validation de modèles 3D de chordome et preuves de concept *in vitro* d'une stratégie radiosensibilisante

Devant le jury composé de :

Pr Blay Jean-Yves	PUPH	Centre Léon Bérard	Président
Dr Schmid-Antomarchi Heidy	DR2	Institut Biologie Valrose	Rapporteuse
Pr De Pinieux Gonzague	PUPH	Université de Tours	Rapporteur
Dr Mir Olivier	PH	Institut Gustave Roussy	Examineur
Dr Maguer-Satta Véronique	DR1	CRCL	Examinatrice
Dr Dutour Aurélie	Cadre biologiste	Centre Léon Bérard	Directrice de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

RESUME DE THESE

Les chordomes sont de rares tumeurs du squelette axial à croissance lente qui sont très agressives localement et ont un potentiel métastatique modéré. Ces tumeurs sont résistantes aux thérapies conventionnelles et restent à ce jour sans traitement spécifique. La prise en charge des patients consiste en une résection chirurgicale de la tumeur avec pour objectif d'obtenir des marges saines, accompagnée de radiothérapie à hautes doses. Malgré cette première ligne de traitement agressive, les récurrences locales sont fréquentes et les options de traitement de seconde ligne sont limitées. Les mécanismes de radiorésistance restent à ce jour inconnus. L'étude des chordomes est rendue difficile par sa rareté qui est reflétée par le faible nombre d'analyses omiques réalisées, souvent sur de faibles cohortes, et par le manque de modèles d'étude. Ce projet de thèse avait donc pour objectifs : i) de compléter la signature transcriptomique des chordomes en le comparant aux autres sarcomes, ii) de développer et de caractériser des modèles cellulaires 3D dans le but iii) d'évaluer la faisabilité d'une approche radiosensibilisante dans ces tumeurs.

Cette étude a montré que le chordome a un répertoire transcriptomique spécifique, qui repose sur une forte activité des voies de signalisation de l'hypoxie et de la glycolyse. Ces travaux ont également montré que les modèles cellulaires 3D de chordome établis sont représentatifs de la maladie en termes d'histologie, d'expression génique et de résistance à la radiothérapie. Enfin, cette étude a montré le bénéfice d'une approche radiosensibilisante dans le chordome par l'inhibition de l'activité aldéhyde déshydrogénase.

Mots clés : *chordome ; modèles 3D ; radiothérapie ; culture 3D ; aldéhyde déshydrogénase ; radiorésistance ; radiosensibilisation ; analyse transcriptomique*

ABSTRACT

Chordomas are rare slow growing tumors of the axial skeleton. These tumors are locally aggressive, refractory to conventional therapies, and currently untreatable. Radical surgery and radiations remain the first-line treatments. Despite these aggressive treatments, chordomas often recur and second-line treatment options are limited. The mechanisms underlying chordoma radioresistance remain unknown, although several radioresistant cancer cells have been shown to respond favorably to aldehyde dehydrogenase (ALDH) inhibition. The study of chordoma has been delayed by small patient cohorts and few available models due to the scarcity of these tumors. We thus determined i) the transcriptomic signature of a cohort of 13 chordomas samples by RNA sequencing; ii) created cellular 3D models of chordoma by using low-adherence culture systems and iii) determined whether pharmacologically inhibiting ALDH increased their radiosensitivity. We found that chordoma samples have a unique transcriptomic signature characterized by a strong expression of hypoxia and glycolysis signaling pathways. Moreover, 3D cellular models of chordoma (derived from primary, relapse and metastatic tumors) reproduce histological and gene expression features of the disease. The metastatic, relapse and primary spheroids displayed high, medium and low radioresistance, respectively. Finally, inhibiting ALDH decreased the radioresistance in all three models.

Keywords: *chordoma, 3D models, hypoxia, radiotherapy, aldehyde dehydrogenase, radioresistance, combination therapy, transcriptomic analysis.*

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les rapporteurs de ce manuscrit : le Dr Heidy Schmid et le Pr Gonzague du Bouexic de Pinieux pour le temps qu'ils ont consacré et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Je voudrais de plus remercier les membres du jury de ma soutenance : le Pr Jean-Yves Blay, le Dr Olivier Mir et le Dr Véronique Maguer-Satta.

Je souhaiterais ensuite remercier les membres de mon jury de CST le Dr Elisabeth Noirault, le Dr Frédéric Mallein-Gerrin et le Dr François Gouin pour leur bienveillance et leur soutien au cours des trois dernières années. Je vous remercie aussi pour tous les questionnements scientifiques qui ont beaucoup apporté à la poursuite de ce projet.

Je souhaiterais remercier les membres de la société Advanced BioDesign : Guillaume Martin, Ismail Ceylan et Mileydis Perez de nous avoir fourni le DIMATE et de nous avoir accordé du temps pour discuter autour du projet.

Je remercie ensuite toutes les personnes qui m'ont apporté de l'aide d'un point de vue expérimental : **Kamel** pour le fonctionnement de l'incucyte, **Priscillia** pour l'aide et la patience que tu as montré avec moi au cytomètre, et **Christophe** pour les formations microscopie qui m'ont été très utiles.

Je remercie la plateforme anapathologie du centre, particulièrement **Nicolas** et **Julie**.

Merci pour les millions de blocs et de marquages que vous avez pu faire pour moi.

Aurélié, ça y est, on y est arrivées !! Je souhaitais te remercier du fond du cœur de m'avoir laissée ma chance et de m'avoir donné l'opportunité de faire ce qui me passionne. Tu m'as fait confiance et toujours soutenue quoi qu'il arrive ! Tu m'as appris à gérer un projet et j'ai pris beaucoup de plaisir à jouer l'apprentie chercheur pendant ces trois ans ! Tu as aussi gardé ton calme à chaque fois que j'ai paniqué, et on peut dire que j'ai souvent paniqué !! Je me souviendrai de tous ces moments autant au travail, que nos petites sorties en tout genre ! On arrive au bout d'une belle aventure, et je suis très heureuse de l'avoir partagée avec toi. Merci pour tout !

Je souhaite ensuite remercier tous les membres de l'équipe :

Laura et **Marie**, merci d'être toujours à l'écoute malgré vos emplois du temps surchargés et pour toutes les discussions qu'on a pu avoir pendant les réunions d'équipe ! **Laura**, merci de m'avoir montré comment dissocier des sphères avant que j'abandonne !!

Kathi, thank you for everything you taught me professionally, and for all our conversations. I hope we will stay in touch and that you'll come visit me when I leave France.

Merci à tous les membres de l'équipe sans qui, la thèse, ça n'aurait vraiment pas été marrant :

Arthur, mon p'tit Tuteur !! Merci de danser autant et d'être aussi facilement distrait !

Paul Huch, Denis, merci pour les goûters au pâté à 18h, les brainstormings infinis, ton enthousiasme dans tout ce que tu entreprends... merci de m'avoir aidé pour la thèse, le papier, les demandes de financement, les manips et j'en passe ! Et merci pour tous ces beaux moments en dehors du labo !! Merci d'être un camarade de soirée hors pair, des soirées du monde endiablées aux Bandol qui dégénèrent, on peut dire qu'on a formé une belle équipe de vainqueurs ! T'es une machine, vive la science !

Paul B, mon Paulo, on s'est suivis depuis le début : on est arrivés en même temps dans cette équipe de bras cassés et on peut dire qu'on s'est éclatés ! Tu as fait des départs et des retours renversants, je me souviens notamment d'un Bandol de réintégration agité ! J'ai été super heureuse que tu reviennes parmi nous et que tu participes en plus à mon projet, ça a beaucoup compté pour moi. Je te souhaite plein de beaux voyages !

Lhorra, Bebess, ça a été un plaisir de travailler avec toi et tes cocas fraises diabète ! On a toujours bien rigolé, et ça c'est le plus important !

Anne-Lise, bb, mon p'tit chouchou de cette dernière année. Tu es arrivée il y a moins d'un an et j'ai l'impression de te connaître depuis toujours ! Je suis contente d'avoir travaillé avec toi et que tu aies fait partie de ce projet ! Et je suis hyper méga contente que tu prennes la relève du chordome, fais attention, une thèse peut en cacher une autre ! Sur ce, tchou tchou !

Nina, ma p'tit Nin's d'amz ! Je suis trop heureuse d'avoir travaillé avec toi ! Je ne sais toujours pas comment tu peux être à la fois aussi à l'écoute des gens qui t'entourent, et d'un autre côté devenir complètement hystéro après un carré de chocolat ! Restes comme ça, t'es juste géniale !

Joseph, Jojo l'abricot, que de chemin parcouru depuis ton arrivée. Quelle était la probabilité pour que tu sois 70+, c'était écrit ! De tes blagues de tonton lourd qui me font

mourir de rire à nos pauses « plainte » les après-midis quand on en avait marre, on s'est toujours bien entendus. Merci à tes voisins de n'avoir jamais rien dit lorsqu'on faisait des soirées chez toi. Tu vas beaucoup me manquer mon Jojo !

Juliette, merci pour toute l'aide que tu m'as apportée, de la traduction de votre langage de bioinfo incompréhensible à notre groupe de travail qui a si bien fonctionné pendant le confinement. Et pour tout le reste : nos soirées, nos discussions, nos rigolades !

Zeuzeu, tu as été mon pilier dans ce labo depuis le début. Je suis arrivée petite stagiaire de M2, et tu m'as accueillie et tout appris avec patience, je te remercie pour ça ! On a passé tout un tas de bons moments : Aussois et notre chambre-bar, les molky sur la place de Monplaisir, les apéros à Lavez les pommes qui dérapent, les portes au Boston. On a aussi développé nos capacités artistiques avec les 100000 de chansons écrites sur toutes les personnes qui ont défilé au lab ! Tu es mon alcoolyte d'amz, je suis fière d'être ton amie, merci d'acheter des pin's !

John, tu es parti il y a déjà un bout de temps, je ne me rappelle plus trop de toi, désolée. Bon, je me rappelle tout de même des 1001 vendredis après-midi à jouer aux webinettes, des midis blind test, des soirées arrosées, des chansons (surtout blot blot, notre plus belle œuvre), de notre semi-marathon, de tes tasses aux champis, de tes cafés dégueu ! Même si je n'ai pas d'âme, tu es désormais mon ami et je suis heureuse d'avoir partagé tous ces moments avec toi !

Laurène, la p'tite réfugiée de l'équipe ! Tu es une jolie personne et je suis heureuse d'avoir fait tout ce chemin à tes côtés.

Merci à tous les autres **Alejandro, Virginie, Iveta, Léa, Thomas, Cindy, Quentin, Momo, Fannoche, Bedouch, Inès** pour votre bonne humeur !

En résumé, **M E R C I**, je suis fière d'avoir été votre collègue, et je vous souhaite à tous le meilleur !!

Merci à mes génies : **Olivier, Romain, Thomas, Pauline, Mégane, Lala, Fabien** ! Vous êtes géniaux, ne changez rien !

Merci à **Tom** et **Domi**, on a vécu tellement de choses maintenant que vous faites définitivement partie de ma famille ! Domi, je me souviendrai toujours du moment où on s'est retrouvées, toutes les deux, comme deux perdues en L2 ! De nos soirées, de nos TP

(particulièrement celui qu'on a fait deux fois), de notre coloc' à Clermont et de tous ces après-midis à monter à cheval !

Merci à **Lolu** et **Ouss**, mes p'tits siciliens préférés !

Merci à **Mélanie**, ma plus vieille amie !

Marion, mon amie de toujours ! Merci de m'avoir soutenue tout au long de ces années et d'être toujours là, que ce soit dans les bons ou moins bons moments. Merci de m'avoir offert des stylos et des carnets tous plus originaux les uns que les autres, pour que je puisse réussir. Je suis sûre que ça a joué ! Je t'aime !

Merci aux p'tits nouveaux : **Judith, Marion, Amaury, Mykolas, Elisa** sans qui le master aurait été nul !

Merci à vous, **Papa** et **Maman**, vous êtes toujours avec moi, motivés et enthousiastes dans tout ce que j'entreprends. Vous n'avez jamais raté un seul événement de toutes mes études. Vous m'avez écouté parler de chordome avec patience, et c'est aussi grâce à vous que j'ai réussi à trouver ce que j'aimais faire. Et ce n'est que le début d'une longue aventure. Gros bisous, je vous aime.

Merci à mon frère **Johann**, d'être toujours calme, de construire chacun de mes cadeaux de Noël à la main, et de me rappeler ce qui est important dans la vie : le fromage et la montagne ! Merci à mes sœurs, **Clémence** et **Estelle**, pour leur gentillesse et leur soutien !

Je souhaite particulièrement te remercier **Alex** ! Merci pour ton aide pour la rédaction ces dernières semaines et pour ton soutien tout au long de cette thèse, même quand je devenais hystérique du travail. J'ai adoré nos brainstormings sur le tableau blanc, nos voyages, nos week-end randos, nos courses à pied (si tu pouvais arrêter de mentir sur la distance qu'il reste à parcourir par contre). Une aventure se termine mais une nouvelle commence à tes côtés et je sais qu'elle va être incroyable ! Merci de m'accepter comme je suis, je t'aime.

Table des matières

Liste des figures	12
Liste des tableaux	13
Liste des abréviations	14
Préambule	17
Introduction bibliographique	21
PARTIE 1 DES TISSUS SAINS A LA TRANSFORMATION TUMORALE EN CHORDOME	
I. Développement et dégénérescence de la notochorde.....	23
1. Développement de la notochorde.....	23
2. Composition de la notochorde.....	26
3. Rôles de la notochorde dans le développement.....	26
4. Dégénérescence de la notochorde et formation de la colonne vertébrale...	27
5. Vestiges embryonnaires à l'origine du chordome.....	28
II. Épidémiologie du chordome.....	30
1. Incidence du chordome.....	30
2. Classification et sous-types histologiques.....	32
III. Altérations génétiques et moléculaires associées au chordome.....	36
1. Brachyury.....	36
2. Prédispositions cytogénétiques.....	37
3. Altérations génomiques.....	39
4. Altérations transcriptomiques.....	39
5. Altérations protéomiques.....	40
6. Altérations épigénétiques.....	40
IV. Les modèles d'étude du chordome.....	41
1. Les lignées cellulaires.....	42
2. Les modèles animaux.....	45
3. Les modèles cellulaires 3D.....	49
PARTIE 2 PHYSIOPATHOLOGIE ET TRAITEMENTS DU CHORDOME.....	
I. Présentation et diagnostic des chordomes.....	52
1. Présentation de la maladie.....	52
2. Diagnostic des chordomes.....	53
II. Prise en charge des chordomes.....	55
1. La chirurgie, pierre angulaire du traitement des chordomes.....	55
2. La radiothérapie des chordomes.....	58
(A) Tumeurs primaires.....	58
(B) Chordomes avancés : rechutes et métastases.....	61
3. Approches thérapeutiques en cours de développement.....	62
(A) Les récepteurs à tyrosine kinase (RTK).....	62
(B) La voie de signalisation PI3K/Akt mTOR.....	64
(C) Les Cycline Dépendante Kinases (CDK).....	65
(D) Vaccin brachyury.....	66
(E) Autres thérapies.....	66
PARTIE 3 MECANISMES D'ACTION DE LA RADIOTHÉRAPIE, RADIORÉSISTANCE ET STRATÉGIES RADIOSENSIBILISANTES.....	
I. Mécanismes d'action de la radiothérapie.....	69
1. Généralités.....	69
2. Effets biologiques des rayonnements ionisants.....	70
3. Mécanismes de réponse à un rayonnement ionisant.....	73

(A)	La reconnaissance des dommages à l'ADN	73
(B)	L'arrêt du cycle cellulaire	74
(C)	La réparation de l'ADN	75
(D)	La mort cellulaire	77
II.	Mécanismes de radiorésistance des cellules cancéreuses.....	79
1.	Mécanismes de radiorésistance des sarcomes.....	79
(A)	Rôle du cycle cellulaire.....	79
(B)	Rôle de p53	80
(C)	Rôle de la réparation à l'ADN	81
(D)	Rôle de la mort cellulaire	81
(E)	Rôle de l'hypoxie.....	82
(i)	L'inhibition des effets indirects de la radiothérapie.....	82
(ii)	L'implication du facteur de transcription HIF-1 α :.....	82
(iii)	L'implication du métabolisme antioxydant.....	83
(F)	Rôle des cellules souches cancéreuses.....	83
2.	Mécanismes de radiorésistance dans le chordome.....	85
(A)	Rôle du cycle cellulaire.....	85
(B)	Rôle de p53	86
(C)	Rôle de la réparation à l'ADN	86
(D)	Rôle de la mort cellulaire	87
(E)	Rôle de l'hypoxie.....	87
(F)	Rôle des cellules souches cancéreuses.....	87
3.	Combinaisons de traitements systémiques à la radiothérapie :.....	88
(A)	Combinaison radiothérapie/chimiothérapie :	89
(B)	Combinaison à un inhibiteur de RTK.....	89
4.	Combinaisons à la radiothérapie dans le chordome :.....	89
III.	L'aldéhyde déshydrogénase, cible thérapeutique radiosensibilisante	91
1.	Les ALDH, facteurs de mauvais pronostic dans les tumeurs solides	91
2.	Les ALDH, marqueurs de cellules souches cancéreuses.....	92
3.	Les ALDH, fonctions cellulaires.....	92
4.	Rôles des ALDH dans la résistance aux traitements	93
(A)	Chimiothérapie :	93
(B)	Radiothérapie :	94
(C)	Thérapies ciblées :	94
5.	Les inhibiteurs d'ALDH.....	94

PARTIE 4 : CONCLUSION ET HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Axe 2 : Établir et caractériser des modèles cellulaires 3D de chordome

Axe 3 : Évaluer une approche radiosensibilisante inhibant les ALDH.....

Partie Expérimentale

PARTIE 1 : ÉTABLISSEMENT DU PROFIL TRANSCRIPTOMIQUE DES CHORDOMES ET COMPARAISON AUX SARCOMES

I. Matériels et méthodes.....

 1. Présentation de la cohorte :

 2. Séquençage de l'ARN

 3. Analyses associées.....

II. Résultats

 1. Analyse des voies de signalisation spécifiques du chordome.....

 2. Comparaison du répertoire transcriptomique des chordomes et des sarcomes

 3. Voies de signalisation différentiellement exprimées entre chordomes et sarcomes

 4. Profil immunitaire transcriptomique des chordomes :

PARTIE 2 ÉTABLISSEMENT ET CARACTÉRISATION DE MODELES CELLULAIRES 3D.....	111
I. Établissement des modèles cellulaires.....	111
1. Caractérisation histologique, morphologique et transcriptomique.....	112
2. Radiorésistance des sphéroïdes.....	113
II. L'aldéhyde déshydrogénase, une cible thérapeutique potentielle pour le traitement du chordome.....	115
1. Expression transcriptomique, protéique et évaluation de l'activité aldéhyde déshydrogénase.....	115
2. Effets de l'inhibition de l'activité aldéhyde déshydrogénase.....	116
PARTIE 3 Publication	118
<i>Discussions et perspectives</i>	137
I. Signature transcriptomique des voies de signalisation du chordome :.....	146
II. Caractérisation histologique, morphologique, et transcriptomique des modèles de chordome :.....	149
III. Les sphéroïdes sont représentatifs de la croissance, l'hypoxie, la production de MEC et la radiorésistance du chordome.....	151
IV. Activités ALDH dans les chordomes et radiosensibilisation :.....	153
PARTIE 4 Conclusion	156
<i>Bibliographie</i>	157

Liste des figures

Figure 1- Développement de la notochorde.	25
Figure 2- Composition de la notochorde.....	26
Figure 3- Dégénérescence de la notochorde et formation des vertèbres..	28
Figure 4- Origine du chordome.....	29
Figure 5- Origine du chordome	30
Figure 6- Histologie et IHC d'un chordome conventionnel.....	33
Figure 7- Différences histologiques entre chordome conventionnel et chondroïde.....	34
Figure 8- Histologie des chordomes peu différenciés.	35
Figure 9- Caractéristiques du chordome en imagerie.	54
Figure 10- Définition des volumes pour la radiothérapie dans les chordomes	59
Figure 11- Cibles de thérapies émergentes dans le chordome	64
Figure 12- Inhibition des CDK4/6 dans le chordome	66
Figure 13- Les différents types de rayonnements ionisants.....	70
Figure 14- Résumé des effets directs et indirects d'une irradiation.....	71
Figure 15- Radiolyse de l'eau	71
Figure 16- Reconnaissance des dommages à l'ADN par ATM et activation de p53	74
Figure 17- Arrêt du cycle cellulaire suite à un dommage dans l'ADN	75
Figure 18- Réparation de l'ADN après une cassure simple ou double brin.	76
Figure 19- Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose induites par les radiations.....	78
Figure 20- Radiorésistance liée à des déficiences du cycle cellulaire	80
Figure 21- Mécanismes de résistance aux radiations des cellules souches cancéreuses.....	85
Figure 22- Rôle des ALDH dans le cancer	93
Figure 23- Carte d'expression des scores d'enrichissement pour chaque fonction biologique par échantillon.....	105
Figure 24- Graphique représentant la répartition de 1450 échantillons de sarcomes et de 12 échantillons de chordomes par la méthode de réduction de dimension UMAP.....	106
Figure 25- Graphiques représentatifs du score NES calculé à partir de la méthode GSEA de chaque échantillon de chordome comparé à l'ensemble des sarcomes.....	108
Figure 26- Carte représentant les niveaux d'expression des gènes rapportés aux cellules immunitaires.....	110
Figure 27- Caractérisation histologique et morphologique des sphéroïdes de chordome.....	112
Figure 28- Visualisation de l'analyse tSNE montrant la clusterisation des 12 échantillons de chordomes et des 3 sphéroïdes	113

Figure 29- Caractérisation du statut hypoxique, de la prolifération et de la réponse aux radiations des sphéroïdes de chordome	114
Figure 30- L'ALDH est une cible thérapeutique potentielle dans le chordome	117
Figure 31- Résumé graphique du travail	118

Liste des tableaux

Tableau 1- Principales altérations cytogénétiques dans les chordomes..	38
Tableau 2- Lignées cellulaires de chordome et caractéristiques	42
Tableau 3- Modèles de xenogreffes de chordome caractérisés	45
Tableau 4- modèles PDX de chordome	47
Tableau 5- caractéristiques des cellules cultivées en 2D et en 3D	50
Tableau 6- Séries de chordomes de la base du cou et du rachis cervical	56
Tableau 7- Séries de chordomes du sacrum et de la colonne vertébrale mobile	57
Tableau 8- Radiothérapie dans le chordome-	60
Tableau 9- Essais cliniques en cours dans le chordome	67
Tableau 10- Les différents types de dommages radioinduits et leurs caractéristiques physiques, biochimiques et biologiques (N. Foray)	72
Tableau 11 -Données cliniques de la cohorte de chordomes.....	102
Tableau 12- Récapitulatif des caractéristiques des sphéroïdes de chordome.....	115

Liste des abréviations

2D	2 dimensions
3D	3 dimensions
ADN	Acide deoxyribo nucleique
AKR1B10	Aldo-Keto Reductase family 1 member 10
Akt	Protéine kinase B
ALCAM	Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
Aldis	Aldehyde dehydrogenase inhibitors
ARID1A	AT-rich interaction domain 1A.
ARN	Acide Ribo-nucléique
ATM	Ataxia Telangiectasie mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia RAD3-related
BNCT	Boron Neutron Capture Therapy
c-met	Hepatocyte growth factor receptor
C3	Complement C3
CAT	Catalase
CD24	Cluster de differenciation 24
CDC25	Cell division cycle 25
CDK	Cycline Dépendante kinase
CDKN2	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CDKN2A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CHK	Checkpoint kinase
CSC	Cellules souches cancreuses
CTV1	volume cible primaire
CTV2	Volume cible secondaire
CTV3	Volume cible tertiaire
DEAB	N,N-diethylaminobenzaldéhyde 4-Diméthylamino-4-méthyl-pent-2-ynthioic acid-S-méthylester
Dimate	
DLEC1	DLEC1 Cilia And Flagella Associated Protein
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMA	Epithelial Membrane Antigen
ENO1	Alpha enolase
FGFR	Fibroblast growth factor
FMR1	Fragile X Mental Retarda+B47tion 1
gp96	Heat shock protein 90kDa beta member 1
GPX	Glutathione peroxidase
GSEA	Gene set enrichment analysis
GSH	Glutathione
Gy	Gray

HDAC	Histone Déacétylases
HIC1	HIC ZBTB Transcriptional Repressor 1
HIF	Hypoxia inducible factor
HOXA1	Homeobox A1
HOXPHO	
S	Phosphorilation oxydative
HPC1	Hereditary human prostate cancer susceptibility locus
IGFR	Insulin growth factor receptor
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KL	Klotho
LHX4	LIM homeobox 4
LMX1A	LIM Homeobox Transcription Factor 1 Alpha
LYST	Lysosomal Trafficking Regulator
MDA	Malondialdéhyde
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MEC	Matrice extra-cellulaire
miRNA	Micro acide ribo nucleique
MMP	Matrix metallo proteinase
mtor	Mamalian target of rapamycin
NAD(P)	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NHEJ	Jonction d'extrémité non homologue
NR	Non renseigné
NSCLC	Non small cell lung cancer
OS	Osteosarcome
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBRM1	Polybromo 1
PDX	Patient's derived xenogreph (xénogreffe dérivées de patient)
PDX	Patient derived xenograft
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
	Sous unité alpha de la phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate
PIK3CA	kinase
PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1
PKM2	Pyruvate kinase M2
PRX	Peroxiredoxines
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RARB	Retinoic receptor beta 1
RASSF1	Ras association domain-containing protein 1
RH	Recombinaison homologue
ROS	Espèces réactives de l'oxygnène
RTK	Recepteur à tyrosine kinase
RunX3	Runt related transcription factor 3
SALL3	Spalt Like Transcription Factor 3
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results
SETD2	SET domain containing 2

siRNA	Petit ARN interferent
	SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent
SMARCB1	Regulator Of Chromatin, Subfamily B, Member 1
SOD	Superoxyde dismutase
T	T-box family gene
TACSTD2	Tumor Associated Calcium Signal Transducer 2
TDM	Tomodensitometrie
TEL	Transfer d'energie lineaire
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TGF- β	Transcription growth factor beta
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TRX	Thioredoxine
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XIST	X Inactive Specific Transcrit
XOP1	Exportine 1
ZIC4	Zic Family Member 4

Préambule

Le chordome est une rare tumeur du squelette axial qui se développe à partir de vestiges embryonnaires de la notochorde. Cette tumeur est très agressive localement et a un potentiel métastatique modéré. Le chordome a été décrit pour la première fois au 19^{ème} siècle et Ribbert fut le premier à en décrire l'origine notochordale en 1895, lui donnant le nom de chordome.

Les chordomes ont une incidence faible de 0,08 pour 100 000 habitants d'après le registre américain SEER (Surveillance Epidemiology and End Results). Ils représentent 1 à 4% des tumeurs osseuses malignes primitives et 20% des tumeurs spinales primaires. Ces tumeurs se localisent préférentiellement dans la base du cou, la colonne vertébrale mobile et le sacrum avec une prédominance masculine (1,5 :1). L'âge médian au diagnostic est situé entre 50 et 60 ans même si ces tumeurs peuvent affecter des personnes de tout âge. Les cas pédiatriques représentent moins de 5% de tous les cas de chordomes.

La prise en charge des patients atteints de chordome a pour pierre angulaire une résection complète de la tumeur avec marges saines. Cependant, cette chirurgie est difficile compte tenu des localisations vertébrales des tumeurs et de leurs extensions proches de la moelle épinière et des paquets vasculo-nerveux. Néanmoins, une résection chirurgicale avec des marges saines reste le seul facteur de bon pronostic de ces tumeurs hautement résistantes aux thérapies conventionnelles. La chirurgie est donc accompagnée de radiothérapie post-opératoire à fortes doses qui permet d'améliorer le contrôle local de la tumeur. Cependant, malgré ces traitements agressifs, environ la moitié des patients vont présenter une récurrence locale dans les 5 ans suivant le premier traitement. C'est pourquoi il est urgent de développer de nouvelles thérapies spécifiques de ces tumeurs. Pour cela, il est nécessaire d'améliorer les connaissances de la biologie des chordomes. Le développement de technologies permettant les études génomiques, transcriptomiques, et épigénomiques des tumeurs ainsi que le développement de nouveaux modèles cellulaires de plus en plus proches de la biologie des tumeurs est indispensable à cette avancée. Toutefois, la

rareté des chordomes rend leur étude difficile. En effet, les études transcriptomiques à partir d'échantillons de patients sont peu nombreuses et souvent réalisées sur de faibles cohortes. De plus, les études sur modèles cellulaires et animaux sont délicates du fait de leur faible nombre. Tous ces facteurs réunis entraînent une absence de progrès dans les traitements des chordomes et peu d'amélioration de la prise en charge des patients. Une approche qui pourrait être applicable assez rapidement dans le traitement des chordomes consisterait à rendre les chordomes plus radiosensibles, améliorant ainsi l'efficacité de la radiothérapie : une réduction des doses utilisées, donc de la toxicité induite aux tissus alentours, un meilleur contrôle local de la tumeur à long terme. Pour cela, il est nécessaire de mettre en évidence des cibles impliquées dans la radiorésistance de ces tumeurs.

Devant ce besoin d'identifier et de tester des cibles thérapeutiques, nous avons mis en place un projet qui a eu pour buts de :

- 1- Mieux comprendre cette pathologie et les altérations moléculaires qui lui sont associées.
- 2- Établir des modèles d'étude reproduisant les caractéristiques principales de la maladie et utilisant des techniques ayant déjà fait leurs preuves dans d'autres tumeurs solides.
- 3- Identifier des candidats pour une approche thérapeutique radiosensibilisante afin de déterminer si le chordome peut bénéficier d'un tel type de thérapie.

Dans la partie bibliographique, ce manuscrit s'attachera à décrire les connaissances actuelles sur le chordome en termes d'origine, d'altérations moléculaires, et de prise en charge thérapeutique ainsi que les raisons pour lesquelles une stratégie radiosensibilisante pourrait être applicable dans ces tumeurs.

Dans la partie expérimentale, ce manuscrit décrira les résultats obtenus au cours de ces travaux qui ont consisté en :

- 1- L'analyse transcriptomique d'une cohorte de chordomes comparée à d'autres sarcomes
- 2- L'établissement et la caractérisation de modèles cellulaires 3D de chordome
- 3- L'évaluation d'une stratégie radiosensibilisante ciblant les aldéhyde déshydrogénases.

Introduction bibliographique

L'objectif de cette introduction bibliographique est d'illustrer l'urgence de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de radiosensibiliser les chordomes. Pour cela, une meilleure connaissance des altérations notamment transcriptomiques de ces tumeurs ainsi que le développement des modèles d'étude permettant de représenter ses caractéristiques principales est nécessaire.

Cette introduction bibliographique est divisée en trois chapitres :

- En premier lieu, nous allons présenter l'origine du chordome, dresser un état des lieux des altérations moléculaires associées à cette maladie et des modèles d'étude existants.
- Dans un second temps, nous allons aborder la prise en charge thérapeutique du chordome et les nouvelles thérapies en cours de développement.
- Enfin, nous décrirons les mécanismes de radiorésistance de ces tumeurs ainsi que les stratégies radiosensibilisantes pouvant cibler ces différents effecteurs. Nous nous concentrerons particulièrement sur l'activité d'une enzyme, l'aldéhyde déshydrogénase.

Classé parmi les sarcomes osseux, le chordome est une tumeur rare du squelette axial. Avec une incidence de 700 nouveaux cas par an en Europe, le chordome représente 1 à 4% des tumeurs osseuses et 20% des tumeurs spinales. De nombreuses études soutiennent l'origine embryonnaire des chordomes qui dériveraient de la notochorde, une structure embryonnaire qui régresse pour former le *nucleus pulposus* du disque intervertébral. Il arrive cependant que cette notochorde ne régresse pas entièrement, pouvant alors être à l'origine de tumeurs bénignes de la notochorde ou de chordomes. La première partie de cette introduction bibliographique s'intéressera aux origines embryonnaires du chordome. Elle présentera le rôle de la notochorde dans l'embryogénèse du disque intervertébral ainsi que la dégénérescence normale ou pathologique de cette structure, cette dernière pouvant être à l'origine de chordome.

I. Développement et dégénérescence de la notochorde

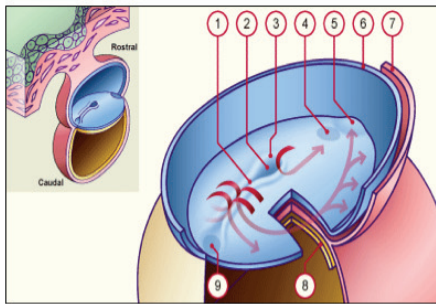
La notochorde représente une structure primordiale du développement embryonnaire. Elle apparaît à la troisième semaine et se transforme rapidement en la structure la plus interne du disque intervertébral : le *nucleus pulposus*.

1. Développement de la notochorde

Les vertébrés appartiennent à la famille des « chordés », se différenciant des autres espèces du règne animal par l'existence d'un endosquelette cartilagineux ou osseux. La notochorde est une structure conservée au cours de l'évolution, on la retrouve chez le vertébré primitif « Amphoxius » où elle forme le squelette entier chez l'adulte. Chez l'Homme, la notochorde est une structure transitoire qui est formée à partir de l'ectoderme au cours de la troisième semaine du développement embryonnaire. Elle joue des rôles de support, de guide et d'induction de la différenciation des tissus¹. Chez l'Homme, la notochorde commence à se former au dix-septième jour

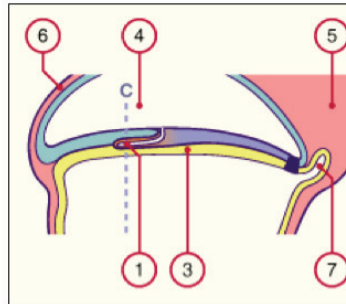
de développement avec la migration de cellules originaires de la ligne primitive qui vont glisser crânialement entre l'endoderme et l'ectoderme. Ces cellules vont s'aligner pour former le processus notochordal qui va continuer de croître jusqu'à rencontrer la plaque pré-chordale. Latéralement, les cellules issues du mésoderme migrent et entourent la notochorde pour former le mésoderme para-axial. L'ectoderme et le mésoderme qui recouvrent la notochorde forment la plaque neurale (Figure 1).

A- Ligne primitive, 18ème jour, vue dorsale



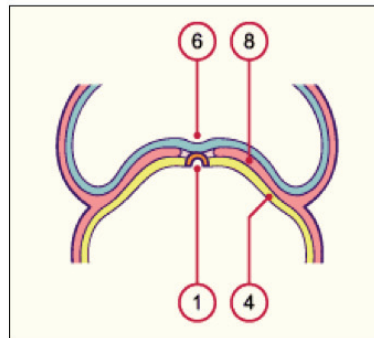
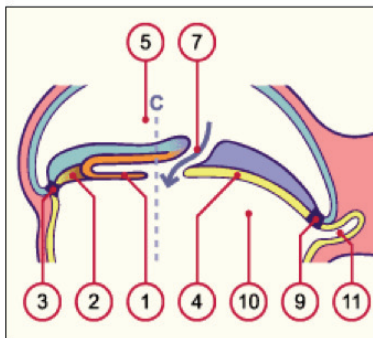
- 1- sillon primitive
- 2- depression primitive
- 3- noeud primitive
- 4- membrane oropharyngée
- 5- aire cardiaque
- 6- bord sectionné de l'amnios
- 7- mésoderme
- 8- endoderme
- 9- future membrane cloacale

B- Processus notochordal 19ème jour



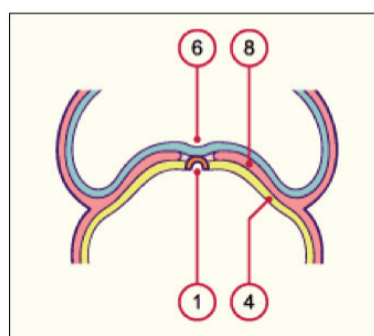
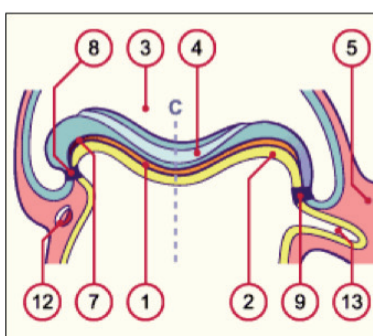
- 1- processus notochordal
- 3- entoblaste embryonnaire
- 4- cavité coelomique
- 5- pédicule embryonnaire
- 6- MEE
- 7- allatoïde

C- Processus notochordal 23ème jour



- 1- processus notochordal
- 2- plaque préchordale
- 3- membrane bucco-pharyngienne
- 4- entoblaste embryonnaire
- 5- cavité amniotique
- 6- gouttière neurale
- 7- canal neurentérique
- 8- mésoblaste intraembryonnaire
- 9- membrane cloacale
- 10- vésicule vitelline
- 11- allantoïde

D- Processus notochordal 28ème jour



- 1- notochorde
- 2- entoblaste embryonnaire
- 3- cavité amniotique
- 4- tube neural
- 5- pédicule embryonnaire
- 6- mésoblaste intraembryonnaire
- 7- plaque préchordale
- 8- membrane bucco-pharyngienne
- 9- membrane cloacale
- 10- aortes
- 11- veines ombilicales
- 12- ébauche cardiaque
- 13- allatoïde

Figure 1- Développement de la notochorde. A et B- Migration de cellules originaires de la ligne primitive (1) qui vont glisser crânialement entre l'endoderme (8) et l'ectoderme. Ces cellules forment le processus notochordal (1). C- Le processus notochordal (1) continue de croître jusqu'à rencontrer la plaque pré-chordale (2). D- Les cellules du mésoderme et de l'ectoderme migrent pour former le tube neural (4) qui recouvre la notochorde (1).

2. Composition de la notochorde

Les cellules notochordales peuvent être polyhédriques, stellaires ou allongées et contiennent un cytoplasme modéré. Dans certaines cellules, ce cytoplasme est rempli de multiples vacuoles donnant le phénotype particulier de cellules physaliphores (Figure 2).

La notochorde se réorganise ensuite pour former une région cellulaire interne entourée d'une gaine externe sous le signal de la voie Notch. Les cellules externes sécrètent une épaisse membrane basale alors que les cellules internes exercent une pression osmotique¹⁻³. C'est donc la gaine rigide qui l'entoure qui lui apporte sa fonction structurale et les cellules à l'intérieur de cette gaine qui sécrète des facteurs permettant la différenciation des structures alentours.

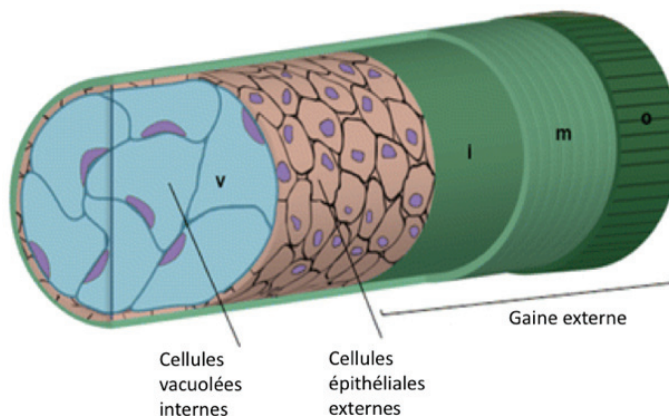


Figure 2-Composition de la notochorde- La notochorde est composée de cellules vacuolées internes, entourées d'une couche de cellules épithéliales. Ces cellules épithéliales sécrètent une épaisse matrice extracellulaire qui forme la gaine externe. Cette structure confère à la notochorde une certaine flexibilité. (Figure adaptée de la publication « The notochord : structure and function ».)

3. Rôles de la notochorde dans le développement

La notochorde va jouer deux rôles primordiaux au cours de l'embryogénèse. Son rôle premier est de former l'axe longitudinal de l'embryon. En effet, de

par sa structure, la notochorde va permettre de constituer un axe solide autour duquel l'embryon va pouvoir se former. Le second rôle de la notochorde est de guider les structures alentours vers la différenciation. Dans ce contexte, son rôle le plus connu est dans la formation et la différenciation du tube neural pour former la moelle épinière et le cerveau. La notochorde va sécréter la protéine Sonic Hedgehog stimulant les cellules du tube neural qui vont pouvoir démarrer leur processus de différenciation. La notochorde va de la même façon guider la formation du pharynx, et de l'appareil digestif³.

4. Dégénérescence de la notochorde et formation de la colonne vertébrale

A partir de la septième semaine du développement, la notochorde va commencer à disparaître de façon concomitante avec la formation des vertèbres et du disque intervertébral. Les vertèbres se forment à partir des somites, éléments dérivés du mésoblaste para-axial.

Deux modèles peuvent expliquer le devenir de la notochorde (Figure 3)⁴ :

- *Le modèle « pression » :*

Alors que les cellules mésenchymateuses se condensent au sein des vertèbres, les cellules notochordales sont poussées dans les zones où les disques intervertébraux se forment.

- *Le modèle « attraction, répulsion » :*

Les zones de formations des disques intervertébraux sécrètent des molécules qui attirent les cellules notochordales. Au même moment, les cellules se situant dans les zones de formation des vertèbres sécrètent des molécules (Ephrin/Eph, Roo/Slit) qui repoussent les cellules notochordales qui vont migrer vers le lieu de formation du disque intervertébral.

Le tissu notochordal va alors former le *nucleus pulposus* du disque intervertébral et sera petit à petit entouré de l'*annulus fibrosus*.

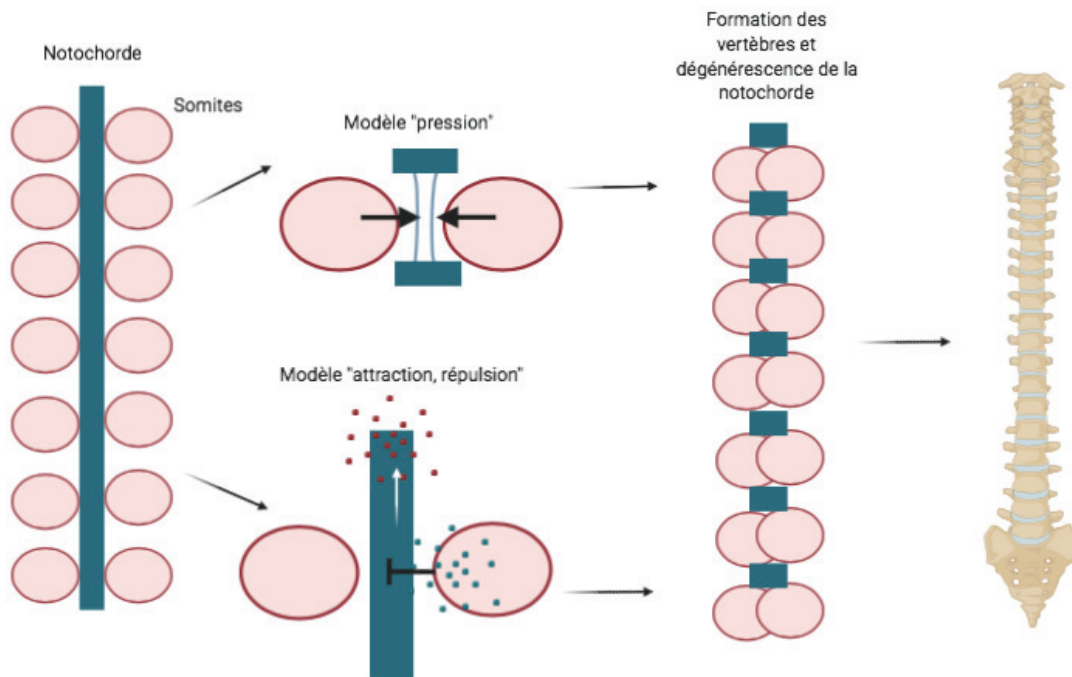


Figure 3-Dégénérescence de la notochorde et formation des vertèbres- Deux modèles peuvent expliquer la disparition de la notochorde au niveau des vertèbres. Dans le modèle de pression, les cellules mésenchymateuses composant les somites se condensent à la place des vertèbres et pousseraient physiquement la notochorde, ce qui la segmenterait et ne la laisserait présente qu'au niveau des futurs disques intervertébraux. Dans le modèle « attraction, répulsion », les cellules mésenchymateuses sécrèteraient des molécules repoussant les cellules notochordales, ce qui entraînerait leur migration vers les zones de formations des disques intervertébraux.

5. Vestiges embryonnaires à l'origine du chordome

Initialement, les chordomes étaient considérés comme des tumeurs dérivées du cartilage. Mais des études plus récentes ont confirmé l'hypothèse de Ribbert de 1895 qui a été le premier à montrer que les chordomes se développent à partir de vestiges notochordaux non différenciés à l'intérieur des corps vertébraux⁵. En effet, il peut arriver que des groupes de cellules notochordales restent bloquées dans la vertèbre lors de sa formation (Figure 4). Ces vestiges notochordaux sont présents chez environ 20% de la population⁶⁻⁸.

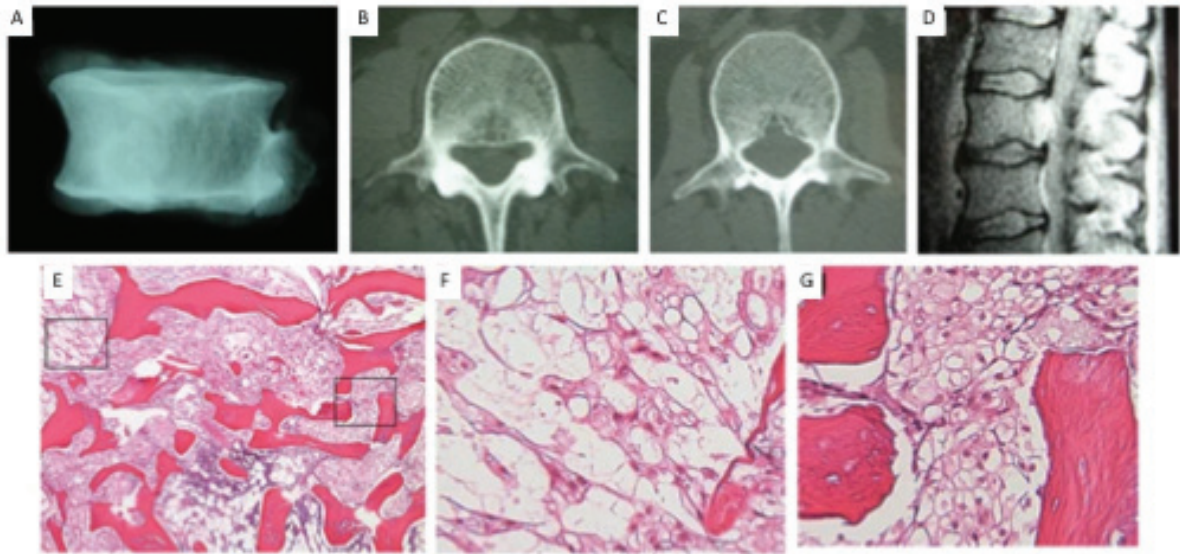


Figure 4- Origine du chordome- Analyses diagnostiques d'un patient présentant une masse avec une partie de vestige notochordal et une partie transformée en chordome. A- Radiographie d'une vertèbre réséquée chez un patient de 48 ans montrant une lésion dense. B&C- Images de tomodensitométrie montrant des zones de lyse compromettant le cortex postérieur. D- IRM avec un haut signal en T2. E- Coloration Hématoxyline/éosine montrant une partie chordome (encadré de gauche) et une partie vestige notochordal (encadré de droite). F- La partie chordome présente des cordes de cellules éosinophes vacuolées dans un fond myxoïde. G- La partie vestige notochordal présente des cellules ressemblant à des adipocytes.

Des études sur des embryons et fœtus humains⁹⁻¹¹ ainsi que chez la souris¹² ont révélé que les cellules notochordales se distribuent sur les sites où les chordomes se développent laissant penser que ces tumeurs proviennent de la transformation des cellules notochordales (Figure 5). Même si aucune évidence directe ne démontre que ces cellules notochordales se transforment en cellules de chordome, les similitudes observées dans leur distribution, leur histologie et leur profil moléculaire suggèrent que les cellules notochordales sont bien à l'origine du chordome^{11,13-15}. Plus récemment, l'analyse moléculaire d'échantillons de chordomes et de tissus notochordaux a permis de détecter l'expression de Brachyury, un facteur de transcription jouant un rôle primordial dans le développement de la notochorde, dans les chordomes^{12,16}. Le rôle de Brachyury dans les chordomes sera développé plus loin. Ainsi, le chordome proviendrait de vestiges notochordaux ayant acquis des mutations au cours du temps. Nous allons désormais nous intéresser à l'épidémiologie, la

classification et l'histologie de ces tumeurs.

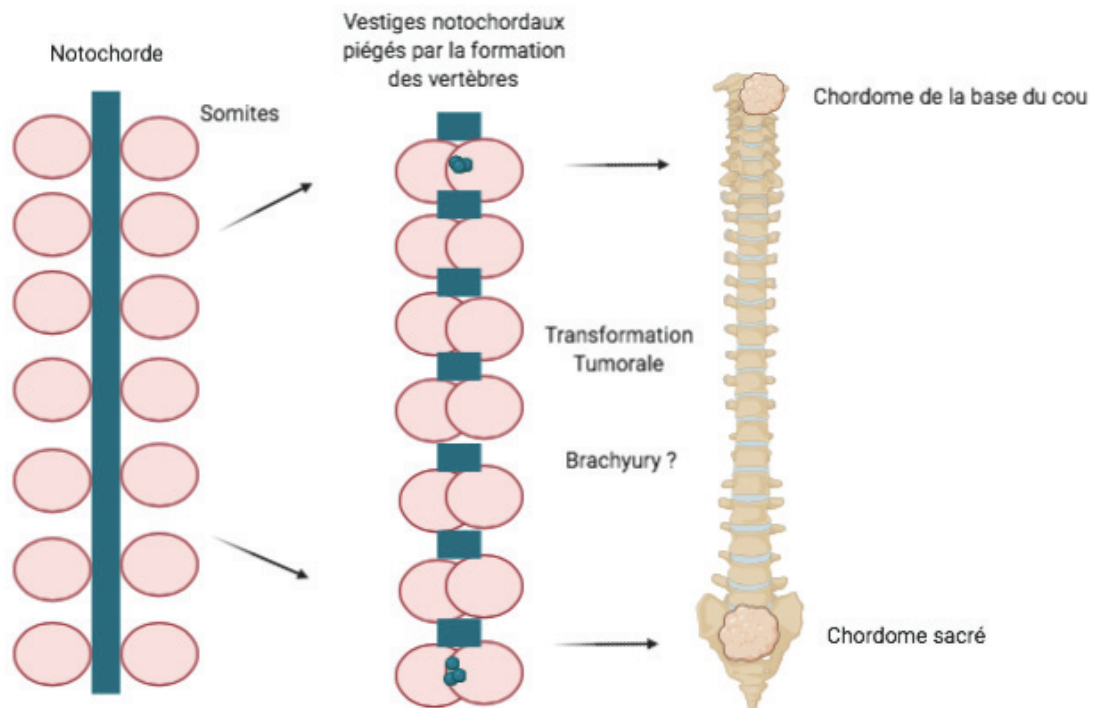


Figure 5-Origine du chordome- Le chordome proviendrait de vestiges notochordaux qui, sous l'action potentielle de Brachyury et d'autres acteurs oncogéniques encore inconnus, se transformeraient en chordome.

II. Épidémiologie du chordome

1. Incidence du chordome

Du fait de sa rareté, la véritable incidence du chordome n'est pas connue. Plusieurs études à large échelle indiquent que le chordome représente 1 à 4% des tumeurs primaires malignes de l'os¹⁷. Cependant, des données plus récentes et plus complètes ont été obtenues par le National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER). Cette étude a comporté 12931 tumeurs malignes primaires de l'os entre 1973 et 2012 et montre que les chordomes représentent 8,3% des tumeurs malignes primaires de l'os arrivant après l'ostéosarcome, le chondrosarcome et le sarcome d'Ewing en termes de fréquence¹⁵¹⁸. Une seconde étude de la SEER entre 1973 et 2003 répertoriant les tumeurs malignes primaires de l'os affectant le squelette axial indique que les chordomes représentent 26%

des tumeurs affectant le squelette axial, arrivant après les chondrosarcomes en termes de fréquence^{16,19}. D'après un rapport du Leeds Regional Bone Tumor Registry, le chordome serait la principale tumeur primaire du squelette axial²⁰.

Le chordome a une incidence d'environ 0,08/100 000/an et affecte principalement la population adulte, avec un âge médian au diagnostic d'environ 58 ans¹⁷⁻¹⁹. L'incidence du chordome demeure très faible chez les enfants, 0,8 pour 10 millions, et augmente avec l'âge jusqu'à atteindre un pic de 26,2 pour 10 millions à 80 ans^{21,22}.

Si les chordomes surviennent un peu plus fréquemment chez l'homme (ratio homme/femme de 1,5:1), une analyse plus récente sur 400 cas de chordomes menée par la SEER a décrit une prédominance féminine pour les chordomes de la base du cou²³. Néanmoins, cette prédominance féminine pour les tumeurs de la base du cou n'est pas retrouvée dans toutes les études²⁴⁻²⁷. Selon l'étude considérée, une prédominance masculine²⁸ ou féminine²⁹ est retrouvée dans les chordomes pédiatriques.

Les chordomes peuvent survenir sur toute la colonne vertébrale. Selon le registre européen, 36% des tumeurs se situent dans la partie sacrale, 30% dans la partie crâniale, 23% dans la partie spinale de la colonne vertébrale et 11% ont d'autres sites de tumeurs primaires³⁰. Les chordomes affectant la base du cou surviennent souvent plus tôt au cours de la vie que ceux se développant dans la colonne vertébrale ou le sacrum³¹. La taille de la tumeur est variable, de quelques centimètres pour les tumeurs de la base du cou à des tumeurs atteignant souvent 10cm dans le sacrum. Le chordome étant très agressif localement, la tumeur peut s'étendre dans l'os jusqu'à gagner la moelle osseuse³².

La survie à 5 ans ajustée en fonction de l'âge est de 61% en Europe : elle semble supérieure chez les enfants (90%) et jeunes adultes (74%) et diminue chez les personnes de plus de 65 ans (48%)²¹. Aucune différence

de survie en fonction du sexe ou de la localisation de la tumeur n'a été observée^{21,33}. La standardisation à l'échelle mondiale du diagnostic des chordomes pourrait améliorer la fiabilité de ces études. Le diagnostic des chordomes implique la connaissance de ses caractéristiques, pour cela une classification des différents sous-types de chordome rencontrés est nécessaire.

2. Classification et sous-types histologiques

S'il s'agit d'une tumeur rare, le chordome n'est pas une entité unique. Sous le terme de chordome, sont regroupés quatre sous-types histologiques : le chordome conventionnel, le chordome chondroïde, le chordome peu différencié et le chordome dédifférencié qui sont différents histologiquement et morphologiquement³⁴.

A. Le chordome conventionnel :

Le chordome conventionnel représente 97% des cas de chordomes. Il possède une architecture lobulaire et est visqueux, grisâtre et bien délimité par rapport aux tissus environnants. Histologiquement, le chordome conventionnel est composé de lobules de cellules arrangées en cordes et en nœuds cohésifs. Certaines cellules présentent au sein de la tumeur s'allongent et en entourent d'autres. Généralement, les cellules tumorales ont une apparence épithéliale avec des noyaux de taille modérée et contiennent des petits nucléoles. Leur cytoplasme est abondant et contient une large ou de multiples petites vacuoles rondes très claires. Ces cellules vacuolées sont connues sous le nom de « cellules physaliphores » et sont caractéristiques du chordome (6A) ³⁵. Dans la plupart des chordomes conventionnels, les mitoses sont peu nombreuses et de nombreux foyers de nécrose peuvent être détectés, surtout dans les tumeurs les plus larges. Les cellules tumorales présentent des projections de type villosités, des amas de glycogène cytoplasmique, des caractéristiques épithéliales incluant

des desmosomes bien formés, des tonofilaments et des lumina intracytoplasmiques^{32,36,37}.

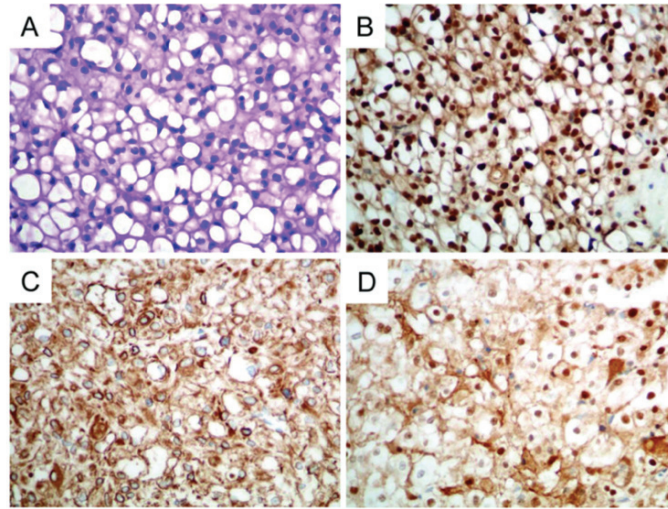


Figure 6- Histologie et IHC d'un chordome conventionnel- A- Coloration hématoxyline-éosine montrant des cellules vacuolées dans un fond myxoïde. Immuno Histo Chimie montrant B- une forte positivité nucléaire pour Brachyury, C- les cytokératines et D- la protéine S100. Figure adaptée de l'article suivant³⁸.

Les chordomes conventionnels expriment typiquement les marqueurs épithéliaux tels que les cytokératines et l'Epithelial Membrane Antigen (EMA) (Figure 6). La plupart expriment également la protéine S100 et conservent l'expression de SMARCB1/INI1. Récemment, Brachyury a été identifié comme marqueur spécifique de tous les chordomes et est utilisé en cas de doute sur le diagnostic^{12,39}. Le stroma des chordomes conventionnels est abondant, mucineux, myxoïde, souvent basophile et entoure les cordes de cellules tumorales^{40,41}. En plus des chordomes conventionnels, d'autres sous types moins fréquents existent : les chordomes chondroïdes (2%) et les chordomes peu différenciés (1%).

B. Le chordome chondroïde

Le chordome chondroïde a été identifié comme une entité clinicopathologique à part entière en 1973. Il est caractérisé par la

juxtaposition de régions de chordome conventionnel et des régions ressemblant plus à un chondrosarcome conventionnel^{39,42,24,42-44}. Le chordome chondroïde survient préférentiellement dans la base du cou, plus rarement dans la colonne vertébrale mobile, et quasiment jamais dans le sacrum. Morphologiquement, les régions de chordome chondroïde peuvent soit fusionner avec, soit être bien délimitées, des régions de chordome conventionnel. La partie chondroïde est caractérisée par des cellules tumorales entourées d'une matrice extracellulaire hyaline solide s'apparentant à une matrice cartilagineuse (Figure 7). La partie chondroïde d'un chordome est variable, représentant peu ou beaucoup de la tumeur totale. La structure³⁷ ainsi que le profil immunohistochimique^{32,44} du chordome chondroïde restent les mêmes que pour le chordome conventionnel.

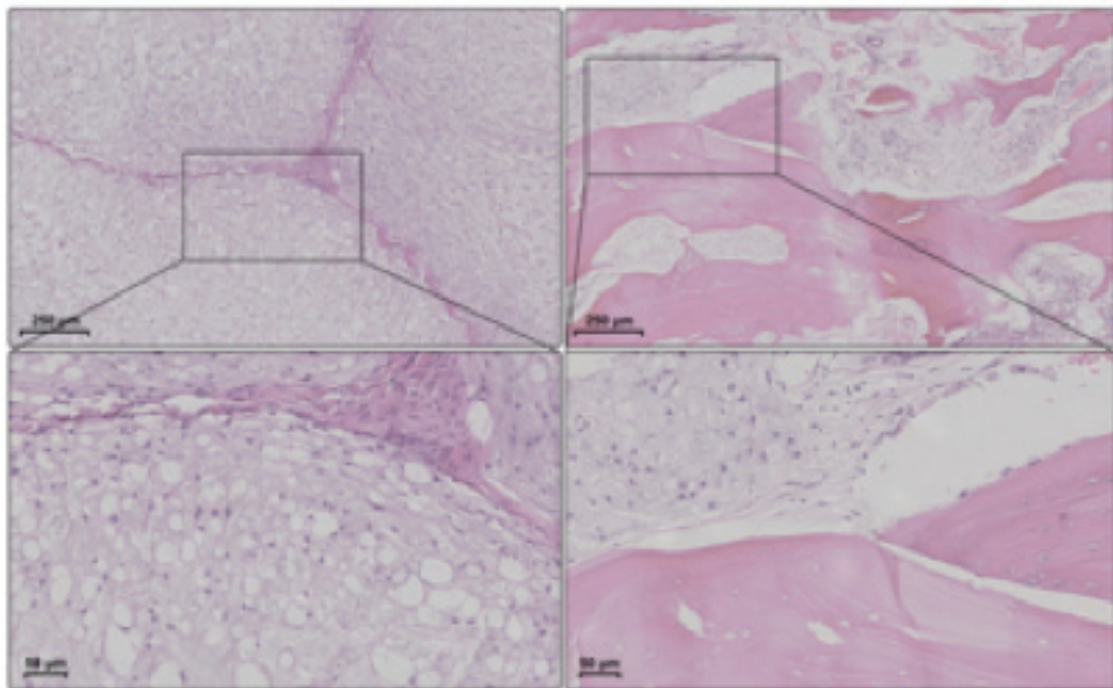


Figure 7- Différences histologiques entre chordome conventionnel et chondroïde. Images représentant des colorations Hématoxyline éosine de A- chordome conventionnel présentant des cellules physaliphores séparées de septas fibreux. B- Chordome chondroïde présentant de larges ilots de matrice de type cartilagineuse ou hyaline juxtaposée à des zones de chordomes conventionnels. Figure adaptée de l'article suivant⁴⁵

C. Le chordome dédifférencié :

Le chordome dédifférencié est le sous-type de chordome le plus rare (1%). Il est composé de zones de chordome conventionnel juxtaposées à des zones à la morphologie d'un sarcome peu différencié à cellules fusiformes de haut-grade (Figure 8). Cette zone dédifférenciée peut apparaître *de novo* dans un chordome primaire, au moment de la rechute ou encore suite à un traitement par radiothérapie⁴⁶⁻⁵⁰. Morphologiquement, la partie dédifférenciée est très différente de la partie conventionnelle avec des caractéristiques structurales et exprime les mêmes marqueurs qu'un sarcome pléomorphe peu différencié. Dans certains chordomes, cette partie dédifférenciée peut ressembler à un ostéosarcome⁴⁷.

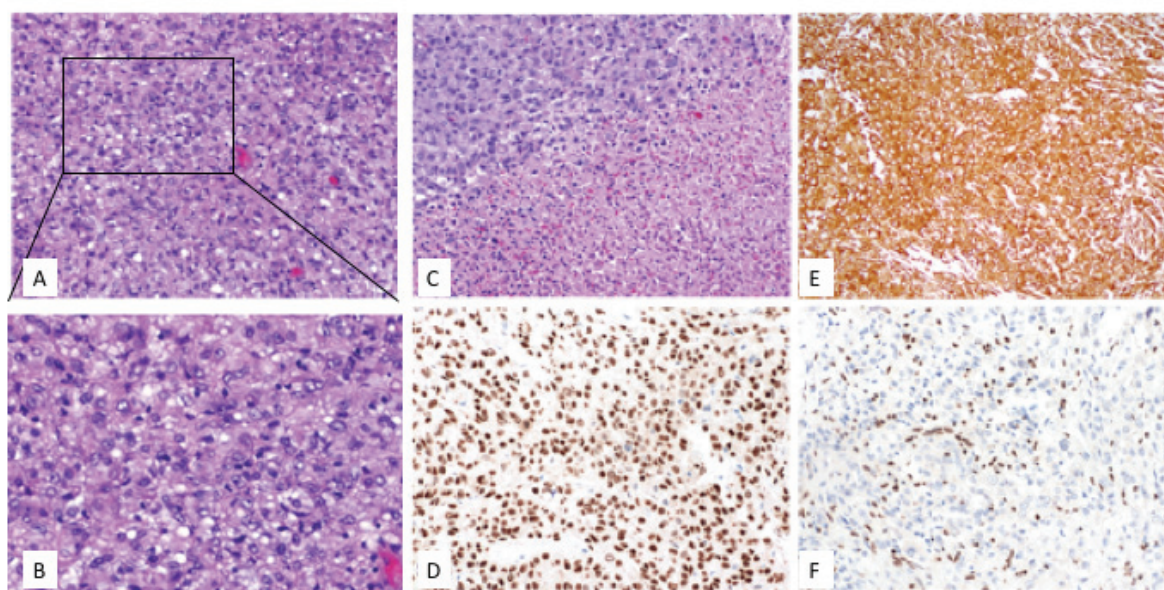


Figure 8- Histologie des chordomes peu différenciés- Images de coloration hématoxyline-éosine montrant des cellules épithélioïdes avec de nombreuses figures mitotiques, des noyaux ovaux irréguliers et un cytoplasme éosinophile (A), avec des zones de nécrose (B). Ces cellules sont juxtaposées à des zones de chordome conventionnel (C). En Immuno Histo Chimie, on observe : une forte positivité nucléaire pour Brachyury (D), une forte positivité pour la cytokératine (E), une faible expression nucléaire d'INI1 (F). Figure adaptée de l'article suivant⁵¹.

La partie dédifférenciée n'exprime pas Brachyury mais peut garder l'expression des cytokératines⁵². D'un point de vue diagnostique, il est important d'identifier un chordome dédifférencié car il s'agit de tumeurs

très agressives qui métastasent dans 90% des cas (au niveau de la peau, des nœuds lymphatiques, des os, des poumons) dont la prise en charge est différente des autres sous types de chordomes^{50,53}.

D. Le chordome peu différencié :

Les chordomes peu différenciés sont diagnostiqués essentiellement chez les enfants et sont caractérisés par des propriétés morphologiques agressives. Ils sont composés de nœuds de cellules épithélioïdes avec un cytoplasme éosinophile abondant. Ces chordomes conservent l'expression de Brachyury et des kératines, contrairement aux chordomes dédifférenciés, et sont caractérisés par la perte de SMARCB1/INI1 (Figure 8)^{51,54-56}.

III. Altérations génétiques et moléculaires associées au chordome

Les études large échelle dans le chordome sont rendues difficiles par sa rareté. En effet, seules des descriptions partielles de ses altérations moléculaires ont été effectuées. Ce paragraphe rassemble les connaissances des altérations retrouvées dans le chordome, avec un accent tout particulier donné à Brachyury, élément qui semble réguler l'oncogénèse du chordome.

1. Brachyury

Le gène T, localisé sur le chromosome 6q27, code pour le facteur de transcription Brachyury. Il est nécessaire pour la spécification du mésoderme et est un régulateur clé de la formation de la notochorde⁵⁷⁻⁵⁹. Différentes études alimentent l'hypothèse de son rôle central dans l'oncogénèse et la progression du chordome.

Son implication dans l'oncogénèse a été révélée par plusieurs études. Une étude réalisée sur 53 échantillons de chordome a montré que tous exprimaient Brachyury et a permis de définir ce facteur de transcription comme un marqueur de diagnostic des chordomes¹². Dans le même temps,

le gène T a été identifié comme un gène de susceptibilité majeur pour les cas de chordomes familiaux. En effet, la duplication de la région 6q27 codant pour le gène T a été retrouvée dans chacun des cas de chordomes de 4 familles⁶⁰. Pour les chordomes sporadiques, ce gène est aussi associé à un risque augmenté de chordome puisqu'un polymorphisme nucléotidique sur le gène T (rs2305089) confère un risque augmenté d'un facteur de 6,1 de développer un chordome^{61,62}. Par la suite, l'implication de Brachyury dans la progression des chordomes a été observée. En effet, l'étude d'une cohorte récente a démontré la corrélation entre une expression élevée de Brachyury et une survie sans progression plus faible (Brachyury élevée : 5 mois ; Brachyury faible : 13 mois)⁶³. Cette expression élevée de Brachyury était également corrélée à une forte expression de la voie de signalisation PI3K/Akt, voie impliquée notamment dans la survie des cellules tumorales⁶³.

2. Prédispositions cytogénétiques

Si l'étiologie du chordome n'est pas clairement définie, il semble que certaines anomalies cytogénétiques et chromosomiques soient impliquées dans l'oncogenèse de cette tumeur. Cette tumeur est caractérisée par de nombreuses anomalies, aucune spécifique à ce type tumoral (Tableau 1). La plupart des études cytogénétiques ont montré des réarrangements structuraux et numériques avec des karyotypes pseudodiploïdes ou hypodiploïdes⁶⁴. Les aberrations les plus fréquemment rencontrées comprennent la perte partielle ou totale du bras de chromosome 1p, 3q, 4q, 10q et 13q, ainsi que le gain partiel ou total de matériel provenant du chromosome 7p, 7q, 12q, 17q, 20q, 22q^{20-24,60,64-68}. Les loci les plus fréquemment délétés ou amplifiés sont les loci 1p36, 1p25, 2p13, et 7q33, ne rappelant aucune altération d'autres tumeurs osseuses.

En revanche, les anomalies sur le locus du gène CDKN2 sont fréquemment rencontrées dans l'ostéosarcome et le chondrosarcome, une étude sur 30 chordomes montrent que ce locus est également délété dans 70% à 85% des chordomes⁶⁴. De plus, le locus codant pour le gène PTEN est délété

dans 25% des chordomes, ce qui est aussi le cas dans l'ostéosarcome⁶⁹. Enfin, le gène SMARCB1 est perdu dans les cas pédiatriques de chordome dédifférencié, ce qui est également fréquent dans les rhabdomyosarcomes⁵⁶.

Tableau 1 - Principales altérations cytogénétiques dans les chordomes

Chromosome	Gain /perte	Gènes touchés	Fonction
1p36	Perte	RUNX3	Facteur de transcription
1p25	Perte	HPC1	ribonucléase
2p13	Perte	TGF- α	Facteur de croissance
7q33	Perte	AKR1B10	Aldoréductase
9p21	Perte	CDKN2	Inhibiteurs de cycline dépendante kinase
10q	Perte	PTEN	oncogène
22q	Perte	SMARCB1	Remodelage chromatine
6q27	Duplication	T	Facteur de transcription

Des études de polymorphismes nucléotidiques réalisées sur des petites cohortes (16 cas de chordome) démontrent que ces tumeurs présentent souvent et de façon aléatoire des pertes du nombre de copies de gènes (3, 9p, 1p, 14, 10 et 13). Le taux de mutation est très faible et les gènes mutés sont souvent impliqués dans la régulation du remodelage de la chromatine. Le gène le plus souvent muté est SETD2⁷⁰.

Les mécanismes de chromotrypsie décrivent un processus mutationnel par lequel des milliers de réarrangements chromosomiques groupés se produisent en un seul évènement dans des régions chromosomiques localisées. Ces mécanismes pourraient être impliqués dans les causes des réarrangements génétiques du chordome^{67,71}. Ainsi, peu de

réarrangements génétiques sont présents dans les chordomes et ne semblent pas spécifiques de cette maladie. C'est pourquoi d'autres études ont visé à évaluer les altérations du chordome à d'autres niveaux.

3. Altérations génomiques

D'autres altérations du chordome ont été décrites, au niveau génomique. L'étude génomique la plus complète a été réalisée sur 104 cas de chordomes sporadiques et a montré très peu de mutations « driver » de la maladie⁷². Cette étude a démontré une duplication du gène T dans 27% des cas, des altérations des gènes remodeleurs de la chromatine tels que ARID1A, PBRM1, et SETD2 dans 17% des cas, ainsi que dans la voie de signalisation PIK3K/Akt (PIK3CA, PIK3R1, PTEN) dans 16% des cas. Des altérations du gène LYST, impliqué dans le trafic des lysosomes, ont aussi été décrites dans 10% des échantillons. Même si ces résultats sont encourageants, il est à noter que 47 cas sur 104 ne présentaient aucun variant, suggérant que des altérations à d'autres niveaux doivent participer à l'oncogenèse dans le chordome.

Une autre étude de séquençage a porté sur la région du promoteur de TERT, qui est très souvent mutée dans les cancers et facteur de mauvais pronostic^{73,74}. Ces mutations dans le promoteur de TERT résultent en une augmentation de sa transcription permettant le maintien de la longueur des télomères des cellules cancéreuses⁷⁵. Une mutation du promoteur de TERT (C228T ou C250T) a été détectée dans 8,7% des cas et associée à une meilleure survie à 10 ans⁷⁶. La valeur clinique de TERT reste à vérifier dans une cohorte de validation puisque dans cette étude, seuls 8 patients possédaient la mutation. A ce jour, aucune autre anomalie n'a été détectée dans le chordome.

4. Altérations transcriptomiques

Une caractérisation extensive du transcriptome permet une meilleure compréhension de la pathologie⁷⁷. Une première cohorte de 6 cas de chordomes et de 14 chondrosarcomes a fait l'objet d'un séquençage ARN

révélant l'expression spécifique des gènes Brachyury, CD24 et des kératines par les chordomes⁷⁸. Une analyse comparative de chordomes spinaux et de la base du cou a ensuite été réalisée. Brachyury demeure au centre du répertoire transcriptomique commun aux deux localisations tandis que l'expression de LMXA1 est plus importante dans les chordomes de la base du cou, et SALL3 plus exprimée dans les chordomes spinaux^{79,80}.

5. Altérations protéomiques

Deux études ont établi un profil protéomique du chordome par spectrométrie de masse⁸¹⁻⁸³. La première a comparé des tumeurs primaires, des rechutes locales ainsi que des tissus sains (n=37) et a montré la surexpression de trois protéines dans les chordomes par rapport aux tissus sains: l'alpha éolase (ENO1), la pyruvate kinase M2 (PKM2) et la gp96⁸³. Ces protéines étaient par ailleurs plus exprimées dans les rechutes locales que dans les tumeurs primaires. Cette augmentation peut être reliée à des situations de stress trouvées au sein des tumeurs : l'hypoxie, le manque de nutriments (glucose) ou une réponse immunitaire. La deuxième étude a été réalisée sur une tumeur primaire et une rechute locale du même patient, et a révélé la sous-expression de p21 (suppresseur de tumeurs) et la surexpression d'ALCAM, protéine impliquée dans les cellules souches cancéreuses, dans la rechute locale⁸². Ainsi, quelques dérégulations de l'expression protéique ont été observées dans le chordome et pourraient être des facteurs prédictifs de progression tumorale.

6. Altérations épigénétiques

L'épigénétique représente l'étude des mécanismes résultant en des changements d'expression de gènes qui n'affectent pas la séquence d'ADN⁸⁴. Les trois principaux mécanismes épigénétiques sont la méthylation de l'ADN, la modification des histones, et la régulation post transcriptionnelle par des ARN non codants : les miRNA.

Le profil de méthylation de l'ADN a révélé 8819 loci (2.9%) différentiellement méthylés dans le chordome⁸⁵. Les gènes retrouvés fréquemment hypo/hyperméthylés sont les gènes C3, XIST, TACSTD2, FMR1, HIC1, RARB, DLEC1, KL et RASSF1⁸⁶. Une étude corrélant des expressions transcriptomiques à des profils de méthylation dans une cohorte de 13 patients a décrit des liens entre l'hyperméthylation des gènes CDKN2A et PTEN avec leur expression transcriptionnelle^{64,87,88}. Ainsi, plusieurs dérégulations épigénétiques pourraient être impliquées dans l'oncogénèse du chordome.

Les Histones Déacétylases sont impliquées dans la condensation de l'ADN qui empêche la transcription. Une étude menée sur 43 chordomes a montré l'expression des HDACs 3 à 6, HDAC6 étant la plus exprimée⁸⁹. La conséquence de ces expressions reste à étudier.

Récemment, plusieurs études ont mis en avant le rôle des miRNA dans l'oncogénèse du chordome, mais aussi dans la régulation de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la prolifération, l'apoptose, l'angiogénèse, l'invasion, le potentiel métastatique⁹⁰⁻⁹⁶. Le miARN-1 qui est fréquemment sous exprimé dans les cancers et est impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire, a été retrouvé sous exprimé dans les chordomes⁹¹. La restauration de l'expression de ce miARN 1 dans une lignée cellulaire de chordome induit une diminution de la prolifération et de la migration cellulaire⁹².

Ainsi, les drivers génomiques et dérégulations moléculaires impliqués dans l'oncogénèse et la progression du chordome sont encore mal connues et peuvent partiellement expliquer l'absence de traitements efficaces spécifiques dans ces tumeurs. Ce retard peut aussi être expliqué par le manque de modèles d'étude du chordome.

IV. Les modèles d'étude du chordome

L'étude des altérations moléculaires du chordome et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques de cette tumeur sont des

problématiques fortes. Pour cela, il est nécessaire de posséder des modèles d'études cellulaires et animaux pertinents. Il existe trois types de modèles de chordome disponibles à ce jour : i) des lignées cellulaires établies à partir d'échantillons de patients, ii) des modèles de xenogreffes sous cutanées à partir de lignées cellulaires, iii) des modèles de xenogreffes à partir de tumeurs de patients (PDX) sous cutanées ou orthotopiques.

Ce paragraphe va s'attacher à présenter les modèles de chordome existants ainsi que leurs limitations et les nouvelles techniques qui permettraient de contourner ces limitations.

1. Les lignées cellulaires

Aujourd'hui, 14 lignées cellulaires de chordome sont disponibles. Ces lignées ont toutes été établies à partir de tumeurs de patients à différents stades de la maladie. Les premières caractérisations de lignées cellulaires de chordome ont été réalisées à partir des années 2010, soulignant le retard dans l'étude des chordomes ^{97,98}. Les caractéristiques des lignées disponibles sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2-Lignées cellulaires de chordome et caractéristiques

Nom	Localisation et statut de la tumeur	Expression de marqueurs chordomes	Anomalies chromosomiques	Publication
U-CH1	Sacrum Rechute locale	Brachury, CD24	Perte du chr. 9p21 (CDKN2)	⁹⁷⁻⁹⁹
U-CH2	Sacrum Rechute locale	Brachyury, CD24	Amplification du gène T Perte du chr. 9p21 (CDKN2)	^{97,98}
MUG-Chor1	Sacrum Rechute locale	Brachyury, CD24	Amplification du gène T Perte de 9p21 (CDKN2), 10p et 10q (PTEN et PDCD4)	¹⁰⁰

JHC7	Sacrum Tumeur primaire	Brachyury, CD24	Amplification du gène T	¹⁰¹
UM- Chor1	Clivus Tumeur primaire	Brachyury, CD24	NR	/
U-CH11	Sacrum Tumeur primaire	Brachyury, CD24	NR	/
MUG- CC1	Clivus Tumeur primaire	Brachyury, CD24	NR	/
CH22	Foie Métastase	Brachyury, CD24	NR	¹⁰²
U-CH12	Sacrum Tumeur primaire	Brachyury, CD24	NR	¹⁰³
U-CH7	Sacrum Tumeur primaire	Brachyury CD24	NR	/
U- CH11R	Sacrum Rechute locale	Brachyury, CD24	NR	/
U- CH17M	Sacrum Métastatique	Brachyury, CD24	NR	¹⁰⁴
U- CH17S	Sacrum Métastatique	Brachyury, CD24	NR	¹⁰⁴
UM- Chor5	Clivus Tumeur primaire	Brachyury, CD24		/

Ces lignées cellulaires ont permis de décrypter des processus biologiques du chordome. Toutefois elles sont cultivées en deux dimensions donc ne reproduisent pas la complexité de l'architecture des tissus, les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire qui s'y produisent¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Hors, ces interactions sont cruciales pour la cellule tumorale et

interviennent dans de multiples processus tels que la différenciation, la prolifération, la viabilité, l'expression de gènes, et le métabolisme¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Les chordomes sont caractérisés par la production d'une matrice extracellulaire (MEC) abondante et une forte expression de gènes impliqués dans la production, le remodelage et les interactions de la MEC avec les cellules. Aux vues de l'importance de la MEC dans le chordome, il semble essentiel d'avoir des modèles cellulaires reproduisant cette MEC. De plus, dans un tissu, toutes les cellules n'ont pas accès uniformément aux nutriments, à l'oxygène et aux métabolites, ce qui n'est pas le cas dans une culture cellulaire adhérente. Le chordome, étant une tumeur particulière à croissance lente et très hypoxique, pourrait bénéficier d'un modèle prenant en compte ces caractéristiques.

De plus, il a été démontré que l'hypoxie est impliquée dans les phénomènes de rechute et de dissémination métastatique¹⁰⁸. En effet, 66% des patients présentant des volumes hypoxiques mesurés par Tomographie à Émission de Positron avec du [18F]-fluoromisonidazole dans leurs tumeurs primaires ont rechuté localement ou développé des métastases alors que seuls 26% des patients ayant une tumeur qui n'a pas progressé présentaient des volumes hypoxiques. Reproduire ces gradients d'oxygène pourrait nettement améliorer la représentativité de ces modèles.

Ces modèles peuvent aussi être de mauvais prédicteurs de la réponse thérapeutique. En effet, il a été démontré qu'une réponse thérapeutique est observée plus facilement à des doses beaucoup plus faibles en culture cellulaire 2D dû à l'accès équivalent au milieu par toutes les cellules^{107,109-112}. Le même constat a été réalisé en réponse à la radiothérapie¹¹³⁻¹¹⁶. Par exemple, des lignées de cancers colorectaux cultivées en 3D montrent une diminution d'un facteur 4 de la mort cellulaire induite par un traitement à la radiothérapie de 10 Gy, et une augmentation de l'IC50 à un traitement au cisplatine et au 5-FU d'un facteur 10¹¹⁷. Ces informations sont d'autant plus importantes puisque, dans le chordome, l'accès aux drogues est limité à la fois par la faible vascularisation et la matrice extracellulaire abondante, deux éléments que les modèles 2D ne reproduisent pas et qui peuvent

influencer la réponse aux traitements. Pour répondre à ces contraintes, des modèles plus proches et plus représentatifs du chordome ont été développés, les modèles animaux.

2. Les modèles animaux

Le premier modèle *in vivo* de chordome a été établi en 2012. Il s'agit d'une xéno greffe sous-cutanée établie à partir d'une rechute de chordome de la base du cou chez la souris¹¹⁸. Des analyses histologiques et de polymorphisme nucléotidique ont confirmé la similitude de ce modèle PDX avec la tumeur d'origine. Cette même tumeur a aussi été cultivée en 2D mais n'a pas été validée en tant que lignée cellulaire, ayant perdu l'expression de Brachyury après plusieurs passages. Deux modèles de xéno greffes chez la souris NOD-SCID ont été développés à partir d'un chordome du sacrum conventionnel et de sa rechute en chordome dédifférencié¹¹⁹. Leur temps de prise de greffe est long puisque la moyenne est d'environ 115 jours. Les tumeurs formées montrent une perte du chromosome 9 portant le gène CDKN2 et une duplication du gène T. D'autres modèles de xéno greffes ont été développés et sont détaillés dans le Tableau 3.

Tableau 3- Modèles de xenogreffes de chordome caractérisés

Nom	Localisation	Statut maladie	Injection	Animal	Type de greffe	Temps de prise de greffe	Publications associées
SF8894	Clivus	Rechute locale	Fragment de 8mm ³	Souris NOD-SCID interleukin-2 receptor gamma (IL-2R γ) null	Sous cutanée	3-4 mois	120

SF10792	Clivus	Primaire	Fragment de 8mm ³	Souris NOD-SCID interleukin-2 receptor gamma (IL-2R γ) null	Sous cutané e	3-4 mois	120
JH2009-11	Clivus	Rechute locale	Cellules dissociées à partir de tumeur fraîche	Souris nude athymique	Sous cutané e	3-4 mois	118
UM-ChoR14	Clivus	Rechute locale	1.10 ⁶	Souris NOD/SCID	Para-sacrale	1 mois	121
	Sacrum	Primaire	Fragment de 4x4 mm	Souris nude	Sous cutané e	25 semaines	122
	Sacrum	Primaire	Suspension cellulaire (tumeur fraîche)	Souris NOD/SCID/IL-2R γ -null (NOG/SCID)	Sous cutané e	3 mois	119
DVC-4	Sacrum	Primaire	1-5.10 ⁶ cellules	Souris NOD/SCID/IL2R γ ^{null} (NSG)	Sous cutané e	4,5 mois	123
JHC7	Sacrum	primaire	500 000 à 2. 10 ⁶ cellules	Souris NCI	Sous cutané e	4 mois	101
U-CH1	Sacrum	Rechute locale	5. 10 ⁶	Souris NOD/SCID/interleukin 2 receptor IL2r γ ^{null}	Sous-cutané e	10 semaines	124
CH22	Foie	métastase	1.10 ⁶	Souris nude Crl:SHO-PrkdcSCIDHrhr	Sous cutané e	1 mois	102
	Clivus	Primaire	Fragment de 3 mm de diamètre	Souris nude	Orthotopique implantation lombosacrée	3 mois	125

Depuis, d'autres modèles PDX de chordome ont été développés et caractérisés par des analyses génomiques et cytogénétiques afin de confirmer leur similitude avec la tumeur d'origine (Tableau 4)^{120,125,126}. Ces modèles permettent à la fois l'étude des anomalies liées à l'oncogenèse et la progression du chordome, et l'évaluation thérapeutique de drogues. En effet, un modèle PDX de chordome clival implanté en sous-cutané chez la souris NOD-SCID a permis de détecter l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt via l'étude du phosphoprotéome et d'évaluer la réponse à un inhibiteur de mTOR (MLN0128)¹²⁰. De plus, les modèles SF8894, CF322 et CF365 ont permis de mettre en évidence l'efficacité de l'inhibiteur d'EGFR afatinib dans lesquels l'afatinib induit une régression tumorale. L'afatinib est désormais en phase II d'essai clinique chez 40 sujets présentant des chordomes avancés¹²⁷. De plus, le modèle CF466 a permis l'évaluation de l'inhibiteur de l'exportin 1 (XOP1), le Selinexor. Dans ce modèle, le traitement à l'inhibiteur Selinexor induit une diminution du volume tumoral de 57,6%¹²⁸.

Si ces modèles ont permis d'effectuer des tests pré-cliniques d'évaluation de l'efficacité de drogues, plusieurs limitations peuvent être soulignées. Leur mode de greffe sous-cutanée n'est pas représentatif du site osseux de la tumeur. Seuls deux modèles de greffe orthotopique avec implantation para- ou intra-vertébrale ont été développés^{121,125}. Le premier avantage de ces sites d'implantation est de reconstituer l'environnement osseux et l'invasion de l'os par la tumeur¹²⁵. Le second avantage est d'améliorer la prise de greffe qui est d'environ 40% lors d'une greffe sous-cutanée et qui augmente à 60% lors d'une greffe orthotopique¹²⁵. L'établissement de ce modèle nécessite une procédure chirurgicale compliquée à réaliser par des spécialistes.

Tableau 4-modèles PDX de chordome

CF322	Clivus	Rechute locale	42	Souris nude	Sous cutanée	¹²⁹
--------------	---------------	-----------------------	-----------	--------------------	---------------------	----------------

CF365	Clivus	Métastase	<20	Souris nude	Sous cutanée	¹²⁹
CF359	Clivus	Métastase	<20	Souris nude	Sous cutanée	/
CF382	Clivus	Rechute	57	Souris nude	Sous cutanée	/
CF459	Clivus	Primaire	<20	Souris nude	Sous cutanée	/
CF427	Clivus	Primaire	55	Souris nude	Sous cutanée	/
CF466	Sacrum	Métastase	58	Souris nude	Sous cutanée	¹²⁸
CF539	Clivus	Métastase	<20	Souris NOD-SCID interleukin-2 receptor gamma (IL-2R γ) null	Sous cutanée	/
CF555	Clivus	Métastase	<20	Souris NOD-SCID interleukin-2 receptor gamma (IL-2R γ) null	Sous cutanée	/

Bien qu'étant de très bons modèles d'études pré-cliniques, les PDX orthotopiques ont encore un taux de prise faible (environ 60%) nécessitant un grand nombre d'animaux, un temps de prise de greffe de plusieurs mois et impliquent une procédure chirurgicale compliquée.

Dans le but de garder les avantages de la culture cellulaire et de réduire les inconvénients des modèles animaux, des modèles alternatifs de culture cellulaire en 3D ont été développés ces dernières années. Ces modèles permettent de récapituler en partie les caractéristiques d'une tumeur, tout en étant rapides, reproductibles et robustes.

3. Les modèles cellulaires 3D

La culture cellulaire 3D permet de générer un environnement pour que les cellules puissent croître et interagir dans les trois dimensions. On distingue deux grands types de culture 3D : les sphéroïdes, culture 3D de lignées cellulaires, et les organoïdes, cultures 3D de tumeurs fraîches de patients gardant l'hétérogénéité tumorale et les cellules souches. Plusieurs techniques de culture 3D existent.

La culture en suspension dans des plaques à faible adhérence nécessite la mise en culture de cellules seules dans du milieu. Ces suspensions cellulaires acquièrent de nombreuses caractéristiques des tumeurs solides, dont les interactions cellules-cellules et cellules-matrice, la présence de jonctions cellulaires, ainsi qu'une résistance accrue aux traitements¹³⁰⁻¹³². Par exemple, des lignées de carcinomes du poumon et de la tête et du cou cultivées en 3D sont plus radiorésistantes que les mêmes lignées cultivées en 2D. Dans des lignées cellulaires de cancer du poumon, des niveaux de condensation de la chromatine plus élevés en 3D permettent d'augmenter la survie et de diminuer le nombre de cassures doubles brin après radiations en 3D¹¹³. Ces cultures sont statiques et ont donc été améliorées par l'utilisation de différents appareils permettant de les rendre dynamiques tels que des bioréacteurs centrifuges ou rotationnels¹³³, des dispositifs microfluidiques^{134,135} ou des systèmes de lévitation magnétique¹³⁶.

La culture en gel permet de reconstituer la matrice extracellulaire présente dans le microenvironnement tumoral. Elle utilise des polymères hydrophiles avec une certaine rigidité qui permet de mimer la matrice extracellulaire. Le collagène, l'alginate ou encore le matrigel sont le plus souvent utilisés, mais d'autres polymères sont en cours de développement¹³⁷. Ce système de culture est utilisé dans tous les types tumoraux, notamment dans les sarcomes¹³⁸.

La culture 3D dans des polymères naturels ou synthétiques est aussi utilisée. Les polymères naturels utilisés varient : collagène, chitosane, glycosaminoglycanes. Les polymères synthétiques contiennent de l'acide

polyglycolique, de l'acide polylactique, etc. et ont une plus forte toxicité. Les techniques associées à ce type de culture sont plus compliquées mais les cultures résultantes forment des architectures mieux définies ce qui améliore la répétabilité, la porosité, la force mécanique, la stabilité structurale et la cinétique de dégradation du polymère^{137,139}. Des polymères de collagène ont par exemple été utilisés dans les modèles 3D de sarcomes d'Ewing et permettent de reconstituer un environnement cellulaire physiologique¹⁴⁰.

Pour le chordome, quelques tests de mise en culture en suspension de lignées cellulaires ont été réalisés^{99,102,141}. Ces essais ont permis de montrer que les cellules de chordome sont capables de croître dans ces conditions, et expriment la vimentine et la cytokératine. Depuis, une étude a reporté la culture d'organoïdes de chordomes en 3D qui ont permis l'évaluation de l'efficacité de l'anticorps anti PD-1 dans des cultures primaires¹⁴². Néanmoins, une caractérisation de ces modèles est nécessaire pour vérifier qu'ils sont stables dans le temps et récapitulent les caractéristiques des tumeurs d'origine.

Les résultats indiquent que les chordomes sont capables de former des sphères lorsqu'ils sont cultivés en plaque à faible adhérence.

Un résumé des avantages et inconvénients des modèles 2D et 3D est dans le tableau suivant (Tableau 5).

Tableau 5-caractéristiques des cellules cultivées en 2D et en 3D

CARACTERISTIQUES		CULTURE CELLULAIRE	CULTURE CELLULAIRE	PUBLICATIONS
DES		2D	3D	
FORME		- plates et	- forme naturelle	143,144
CELLULES		- allongées.	- des cellules	
		- couche unique	- conservée	
		- de cellules	- agrégats 3D	
			- plusieurs couches	
			- de cellules	

EXPOSITION DES CELLULES AU MILIEU CELLULAIRE	<ul style="list-style-type: none"> - même quantité de nutriments et d'oxygènes - même stade de cycle cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> - gradient de nutriments et d'oxygène - cellules internes au sphéroïde peu d'oxygène et de nutriments donc moins actives 	106,143
JONCTIONS CELLULAIRES	rarement présentes	souvent présentes	105,107,109,143,145
SENSIBILITE AUX DROGUES	une résistance plus faible drogues pas bien métabolisées.	Résistance plus forte, meilleur métabolisme des drogues	109-112,134
PROLIFERATION	Prolifèrent souvent plus rapidement, de façon non naturelle.	taux de prolifération plus réalistes	105,143
RESISTANCE AUX RADIATIONS	plus sensibles aux radiations	plus résistantes	113-116

Ainsi, peu de modèles 3D de chordome existent dû à la complexité de la mise en place du protocole. Pourtant, ces modèles représentent une alternative à la culture 2D et aux modèles animaux intéressante qui pourrait être bénéfique à l'étude de cette tumeur, notamment pour le domaine translationnel de l'évaluation de nouvelles cibles thérapeutiques.

Cette seconde partie va maintenant s'attacher à décrire le diagnostic, la prise en charge actuelle et les traitements du chordome.

I. Présentation et diagnostic des chordomes

1. Présentation de la maladie

Du fait de leur indolence, les chordomes sont diagnostiqués tardivement, les signes les plus fréquents sont donc des douleurs locales dues à l'invasion et la compression des tissus alentours (rectum, œsophage, trachée, racine nerveuse cauda equina, nerf abducens). Du fait de leur diagnostic tardif, environ 20% des patients présentent déjà des métastases au diagnostic initial localisées préférentiellement dans les poumons, les os, la peau, le cerveau^{146,147}.

Certains signes sont spécifiques de la localisation de la tumeur. Les chordomes de la base du cou peuvent notamment causer des diplopies, maux de tête, de l'hypopituitarisme et des neuropathies craniales^{24,148-154}. Les tumeurs spinales, quant à elles se localisent dans le corps vertébral. Les symptômes neurologiques vont apparaître selon la localisation de la tumeur : douleurs radiculaires, faiblesse des jambes ou des bras, déficits sensoriels, etc^{148,155-159}.

Lorsque la tumeur survient dans le sacrum, elle dispose d'un espace relativement large pour se développer. Les symptômes associés au chordome sacré sont peu spécifiques avec des lombalgies, douleurs aux fesses, neuropathies accompagnées ou non de troubles de la démarche¹⁴⁶. Les symptômes étant peu spécifiques, les examens d'imagerie sont nécessaires au diagnostic du chordome.

2. Diagnostic des chordomes

Le diagnostic du chordome combine l'imagerie médicale et l'anatomopathologie.

Tout d'abord, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) de la tumeur et de toute la colonne vertébrale va permettre de délimiter la tumeur des structures adjacentes. Une imagerie par tomodensitométrie (TDM) peut être ajoutée s'il y a un doute de diagnostic¹⁶⁰.

Les données d'IRM vont révéler la présence d'une masse le long du squelette axial, souvent envahissant l'os voisin, masse d'intensité similaire aux autres tissus alentours en T1 mais apparaissant hyper intenses en T2 (Figure 9)¹⁶¹¹⁶².

Un challenge du diagnostic est de différencier les chordomes des tumeurs bénignes de la notochorde (TBNC) et des chondrosarcomes. Les TBNC sont souvent au centre du corps vertébral. Lorsqu'elles sont détectées en imagerie, ces tumeurs apparaissent sclérotiques en TDM¹⁶³. Pour différencier un chordome d'un chondrosarcome, une IRM à diffusion montre un coefficient de diffusion plus élevé dans les chondrosarcomes que dans les chordomes¹⁶⁰.

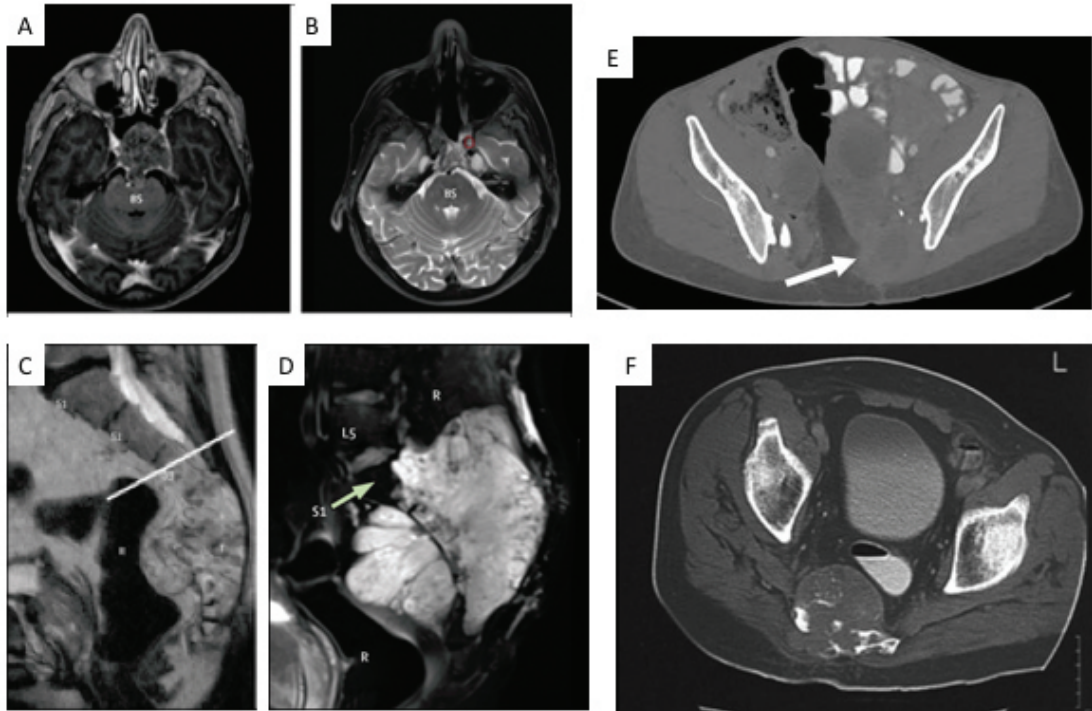


Figure 9-Caractéristiques du chordome en imagerie-A- IRM en T1 après injection produit de contraste montrant une lésion au niveau du clivus. B- IRM en T2. C- IRM en T1 après injection de produit de contraste montrant une lésion sacrale. D- IRM en T2 montrant une lésion sacrale. E-F- CT scan montrant des lésions sacrales.

L'examen par imagerie est complété par un examen anatomopathologique qui reste essentiel pour définir le grade et le sous-type de chordome. Cet examen est réalisé sur une biopsie dont le parcours de la biopsie est retiré lors de l'exérèse afin d'éviter la propagation de cellules tumorales.

Au niveau macroscopique, les chordomes sacrés se présentent sous la forme de tumeurs blanc-bleutées souvent entourées d'une pseudo-capsule. Au niveau microscopique, elles présentent une architecture lobulaire organisée en cordons fibreux composés de cellules à l'apparence fibroblastique qui encapsulent un groupe de cellules de type physaliphores. Ces cellules sont grosses, épithélioïdes, hautement vacuolées et entourées d'une matrice extracellulaire unique et complexe. Des zones de nécrose sont souvent observées au centre de la tumeur. Les chordomes expriment les cytokératines de faibles poids moléculaires et présentent une expression variable de la protéine S100, de CD24 et de l'Epithelial Marker Antigen

(EMA). Un immunomarquage pour le facteur de transcription Brachyury peut être utile pour un diagnostic différentiel^{11,164,165}.

II. Prise en charge des chordomes

Lorsque le diagnostic est confirmé, le choix du traitement d'un chordome sacré prend en compte de nombreux facteurs : tumeur primaire ou rechute, localisation, résectabilité, possibilité de délivrer de la radiothérapie, morbidité associée aux procédures. Depuis 2013, des standards de prise en charge thérapeutique ont été définis sous l'égide de la Chordoma Foundation. Cette standardisation a permis d'appréhender l'efficacité de différents traitements en étant capable de regrouper des informations relatives au traitement des patients à l'échelle mondiale.

La chirurgie et la radiothérapie sont les pierres angulaires du traitement des patients¹⁶⁶.

1. La chirurgie, pierre angulaire du traitement des chordomes

La chirurgie est planifiée pour définir les marges de résection, qui correspondent à la zone que le chirurgien enlève autour de la tumeur, et inclure toutes les extensions tumorales. Les marges chirurgicales représentent le facteur pronostic le plus important chez les patients atteints de chordome¹⁶⁷. Les techniques de chirurgie sont spécifiques à la localisation de la tumeur mais l'objectif reste une excision complète avec marges saines. La qualité de la chirurgie est divisée en 3 catégories : i) R0, résection totale avec marge microscopique négative (>1mm) et aucune évidence de tumeurs au niveau macroscopique dans les marges; ii) R1, marges microscopiques <1mm, pas de tumeur au niveau macroscopique dans les marges ; iii) R2, présence de tumeur macroscopique résiduelle dans les marges¹⁶⁸.

Une résection R0 avec marges saines est obtenue dans environ 50% des cas pour les chordomes sacrés et spinaux. Ce chiffre diminue à 30% pour les tumeurs de la base du cou. Si la résection en-bloc R0 n'est pas faisable ou si les séquelles sont trop importantes, il est possible d'éviter certains

nerfs aux dépens de marges microscopiques positives. Une résection R1 doit être envisagée si la résection R0 est impossible pour les chordomes de la base du cou.

Concernant les tumeurs sacrées, le fascia sacral étant très souvent infiltré, il doit être inclus dans la résection. Afin de garder la tumeur recouverte de tissus sains, la résection doit aussi inclure le mésosigmoïde et le mésorectum. La chirurgie va entraîner une morbidité importante avec des impacts sur les intestins, la vessie, et la motricité potentiellement¹⁶⁰. Concernant les tumeurs de la base du cou, l'approche la plus directe avec le trajet chirurgical le moins destructeur doit être privilégié.

L'incidence de rechutes locales des chordomes sacrés même ayant reçu une résection complète (R0) est de 30% à 5 ans, 46% à 10 ans et 57% à 15 ans (Tableau 7 et 8). Même 15 ans après la chirurgie initiale, le risque de rechute reste présent. En cas de rechute, seule une minorité des patients présentant une rechute peuvent être soignés par chirurgie et/ou radiothérapie et le contrôle à long terme de la tumeur représente un réel challenge¹⁶⁷. Dans le cas de rechutes, la résection complète de la tumeur doit être effectuée lorsque c'est faisable et que la morbidité associée n'est pas trop élevée¹⁶⁶.

Tableau 6 - Séries de chordomes de la base du cou et du rachis cervical

Étude	Nb patients	Localisation	Qualité des marges	Nombre de patients recevant de la RT	Suivi (mois)	Survie à 5 ans	Survie sans progression à 5 ans	Survie à 10 ans	Survie sans progression à 10 ans
Sen et al. 2011	71	Base du cou et jonction craniocervicale	R1=59 R2=41	44	66 (médiane)	75%	NR	NR	NR

Wu et al.	106	Base du cou	R1=78 R2=22	40	64 (moyenne)	68%	47%	60%	12%
Choi et al.	97	Jonction craniocervicale	NR	97	50 (moyenne)	55%	NR	36%	NR
Wang et al.	14	Rachis cervical	R1=5 R2=9	14	59 (moyenne)	86%	50%	NR	NR
Yasuda et al.	40	Base du cou, jonction craniocervicale, cervical	R1=17 R2=23	30	57 (médiane)	70%	NR	NR	NR
Di Maio et al.	95	Base du cou	R1=67 R2=28	33	38 (moyenne)	74%	56%	NR	NR
Ouyang et al.	77	Base du cou	R1=57 R2=9	22	60 (moyenne)	71%	45%	46%	18%
Rachinger et al.	47	Base du cou	R1=15 R2=81	30	62 (médiane)	83%	NR	NR	NR

Tableau 7- Séries de chordomes du sacrum et de la colonne vertébrale mobile

Étude	Nb patients	Localisation	Qualité des marges	Nombre de patients recevant de la RT	Suivi (mois)	Survie à 5 ans	Survie sans progression à 5 ans	Survie à 10 ans	Survie sans progression à 10 ans
York et al	27	Sacrum =27	R0/R1=15 R2=12	13	43 (médiane)	NR	NR	NR	NR
Bergh et al.	39	Sacrum =30 Colonne =9	R0=17 R1=5 R2=17	7	97 (moyenne)	84%	66%	64%	NR

Fuchs et al.	52	Sacrum =52	R0=21 R1/R2=31	0	85 (moyenne)	74%	59%	52%	46%
Park et al.	27	Sacrum =27	R0=16 R1/R2=5	27	106 (moyenne)	83%	61%	63%	49%
Boriani et al.	48	Sacrum =0 Colonne =48	R0/R1=10 R2=32	34	NR	54%	NR	21%	34%
Stacchiotti et al.	130	Sacrum 108 Colonne =22	R0=48 R1=35 R2=47	42	142 (médiane)	78%	52%	54%	33%
Clark et al.	30	Sacrum =30	R0=0 R1=28 R2=2	10	45 (médiane)	67%	NR	NR	NR

Après avoir réséqué la tumeur, une reconstruction est nécessaire.

2. La radiothérapie des chordomes

Le contrôle local de la tumeur étant difficile à atteindre, une thérapie adjuvante est nécessaire. Cependant, les chordomes sont résistants à la chimiothérapie qui n'est donc pas utilisée couramment dans le traitement de ces tumeurs. Une radiothérapie à hautes doses est appliquée aux patients lors d'une résection incomplète dans le but d'améliorer le contrôle local de la tumeur. Les types de rayonnements utilisés sont principalement les photons, et plus récemment les protons (Partie 3, I.1.).

(A) Tumeurs primaires

Dans le cas d'une tumeur primaire, le volume soumis à la radiothérapie doit comprendre le volume cible primaire (CTV1), incluant toutes les zones où la tumeur s'étendait avant la chirurgie. Il doit contenir les zones à haut risque de diffusion, notamment les muscles glutéaux, piriformes, iliaques et quadrilatéraux mais aussi les corps vertébraux qui encadraient la tumeur. Le volume secondaire (CTV2) recevra une dose plus importante et

comprend tous les résidus tumoraux microscopiques présents après chirurgie, c'est-à-dire les marges de résection positives. Enfin le troisième volume (CTV3) correspond à tous les sites où une maladie résiduelle macroscopique est encore présente après résection (Figure 10)¹⁶⁰.

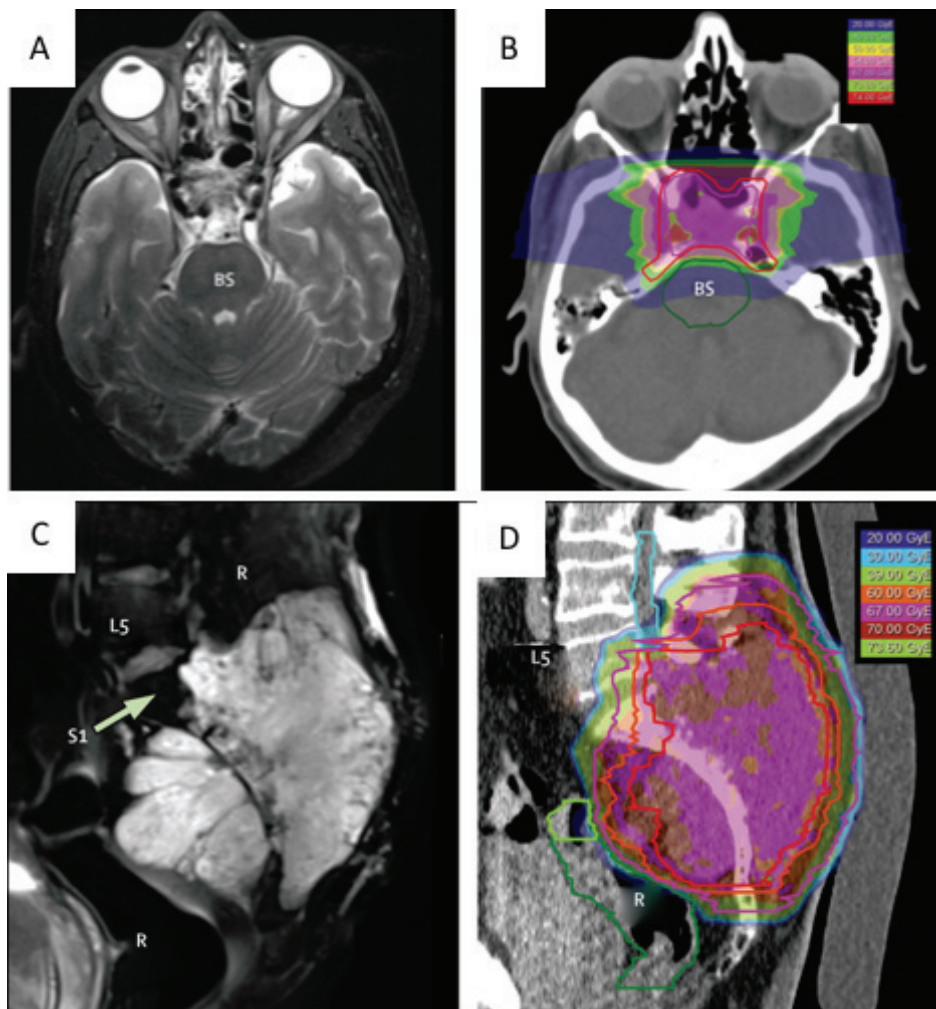


Figure 10-Définition des volumes pour la radiothérapie dans les chordomes- IRM de patients présentant un chordome du clivus (A), et du sacrum (C), et définition des volumes de radiothérapie correspondants en rouge le CTV1, en jaune le CTV2 et en vert le CTV3 ((B & D).

La radiothérapie à haute dose par protons ou photons est appliquée dans le cas de résections R1 et R2 pour les tumeurs primaires. Elle n'est pas systématiquement utilisée en cas de résection R0. Pour les chordomes sacrés, la dose distribuée au CTV1 est de 70 GyE dans le cas de résections R0 ou R1. Une dose de 74 GyE est délivrée au CTV2 et de 50-54 GyE au CTV1 lorsqu'une résection R2 est effectuée¹⁶⁰.

Lorsque la radiothérapie est appliquée aux chordomes de la base du cou, 74Gy doivent être délivrés aux CTV2 et CTV3 par fraction de 1,8 à 2Gy de

photon ou proton thérapie. Un hypofractionnement est possible avec 16 à 22 fractions de 3 à 4,2Gy pour les CTV2 et CTV3 et 36Gy pour le CTV1 avec des ions carbonés. Ces règles pour le traitement par radiothérapie ont été mises en place grâce à l'analyse des résultats des études se trouvant dans le tableau 9.

Tableau 8-Radiothérapie dans le chordome-

Nombre de patients	Traitement	DOSE	Type de radiations	Résultats	Référence
8	Chirurgie (80% R0)	72à 79,2 Gy 40 à 44 frac	Protons ou protons+IMRT	CL à 3 ans=86%	169
34	Chirurgie R1/R2	70,2Gy	Photon+ protons IMRT ou 3D conformationnelle	CL à 4 ans=58%	170
57		69,6Gy	protons	CL à 5 ans=87,9%	171
24	Aucun	77,4Gy	Photons+protons	CL à 5 ans=79,8%	172
5	Aucun	70Gy 28 frac	Proton + hyperthermie	3 patients= réponse partielle	173
41	Aucun		13 tomothérapie, 28 proton+tomothérapie	CL à 5 ans=71%	174
100	Aucun	74Gy	Proton seul 88% Proton +photon	CL à 5 ans=63%	175
33	Aucun	70,4Gy	Proton	CL= 89,6%	176
13	Chirurgie	70Gy	5xproton+photon IMRT, 1x photon + boost proton (3x12Gy) 12x protons	CL à 2 ans= 58%	177
715	Définitive (107) Péri-opératoire (608)	>70Gy	Protons ou Photons	NR	178

CL=Contrôle local

(B) Chordomes avancés : rechutes et métastases

La radiothérapie peut être une alternative à la chirurgie accompagnée de radiothérapie, sachant qu'aucune des deux n'ont réellement montré d'efficacité.

Les techniques et doses sont les mêmes que pour les tumeurs primaires. Pour les patients qui ont été traités uniquement par chirurgie, une dose de 74 Gy par photon ou proton thérapie fractionnée doit être appliquée. Pour ceux ayant déjà été traité par radiothérapie, l'utilisation d'ions carbonés ont une énergie de transfert plus élevée que les protons ou les photons et semblent montrer moins de toxicité. Cependant, aucune étude n'a été faite pour déterminer la dose optimale ou le schéma de fractionnement¹⁶⁶.

La radiothérapie à haute dose peut entraîner des effets secondaires à long terme dus à sa toxicité. Sont à noter notamment des neuropathies et des fractures sacrales chez environ 50% des patients¹⁶⁷.

Des études ont montré que la radiothérapie permet d'améliorer le contrôle local de la tumeur et la survie à 5 ans (Tableau 9). En effet, la radiothérapie améliore la survie à 5 ans des patients ayant subi une résection incomplète (de 71% à 82%)¹⁷⁹. Seuls les traitements à haute dose de radiothérapie montrent une efficacité. La proton thérapie semble être plus efficace que la radiothérapie conventionnelle. En effet, dans une étude rassemblant 715 patients chordome a comparé l'efficacité de la proton thérapie à la radiothérapie conventionnelle. La proton thérapie permet d'avoir un taux de survie à 5 ans de 100% alors qu'il est de 34% pour la radiothérapie conventionnelle. Cependant, dans cette étude, le contrôle local de la tumeur n'est pas évalué et la différence de taille, d'âge et de stades de la maladie entre les groupes peuvent impacter les résultats obtenus. En effet, 600 patients d'âge moyen de 56 ans ont été traités par proton thérapie, alors que 100 patients d'âge moyen 71 ans ont été traités par radiothérapie conventionnelles.

Des études randomisées comparant l'efficacité de la chirurgie seule, la chirurgie accompagnée de proton thérapie ou radiothérapie

conventionnelles seraient nécessaires pour évaluer les bénéfices de la radiothérapie dans le chordome.

Avec ces traitements, la survie médiane des patients est d'environ 6 à 7 ans, ce chiffre au demeurant extrêmement variable selon le moment du diagnostic et les options de traitement possibles à ce moment²³. Ainsi, il existe un réel besoin de nouveaux traitements pour les chordomes. Au cours des dernières décennies, de nouvelles approches thérapeutiques ciblées ont été développées et certaines appliquées au chordome.

3. Approches thérapeutiques en cours de développement

Les thérapies ciblées ont été évaluées dans de nombreux types tumoraux, dont certaines ont été évaluées dans le chordome.

(A) Les récepteurs à tyrosine kinase (RTK)

Les RTKs sont des glycoprotéines transmembranaires comprenant un ectodomaine externe à la cellule en N-terminal, un domaine transmembranaire et un domaine cytosolique. Ces RTKs, tels que l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), le Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR), l'Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR ou cMet), l'Insulin Growth Factor Receptor (IGFR), sont activés par la liaison de leurs facteurs de croissance respectifs à la surface de la cellule. La cascade de signalisation en résultant va modifier l'expression de multiples gènes impliqués dans différents processus cellulaires. Dans les cancers, des inhibiteurs aux RTKs ont été évalués et certains sont utilisés aujourd'hui en clinique en monothérapie ou combinaison¹⁸⁰. Dans le chordome, des études ont montré des dérégulations de ces voies de signalisation et ont évalué des inhibiteurs de RTK à la fois lors d'essais pré-cliniques et pour certains, en essais cliniques (Figure 11).

- *EGFR* :

In vitro, l'action de différents inhibiteurs d'EGFR a démontré une efficacité dans le chordome. Par exemple, l'afatinib a une IC50 de 0,014 μ M pour la lignée U-CH1, 0,023 μ M pour la lignée UM-ChoR1, 0,531 μ M pour la lignée U-

CH2¹²⁹. Le lapatinib a une EC50 de 6,163nM dans la lignée U-CH1 et de 1,527 μ M dans la lignée MUG-Chor1.

In vivo, l'afatinib induit un arrêt de croissance tumorale dans le modèle de PDX CF322 et même une régression tumorale pour le PDX CF365¹²⁹. Le sapitinib induit un arrêt de croissance tumorale dans un modèle de xenogreffe de la lignée U-CH1 chez la souris¹⁸¹.

Ces résultats étant encourageants, un essai clinique de phase 2 testant l'efficacité du lapatinib chez 18 patients atteints de chordomes avancés a été réalisé. Six patients ont montré une réponse partielle, 7 ont vu leur maladie se stabiliser et cinq progresser¹⁸². Ces résultats sont encourageants et semblent montrer une efficacité des inhibiteurs d'EGFR chez certains patients. Déterminer au préalable les patients dont la tumeur exprime fortement EGFR pourrait être intéressant pour prédire de l'efficacité de ces inhibiteurs.

- *PDGFR*

In vitro, l'inhibition de PDGFR- β par siRNA sur la lignée U-CH2 diminue ses capacités d'invasion¹⁸³. De plus, l'inhibition de PDGFR par un inhibiteur pharmacologique induit une diminution de la croissance d'un facteur 1,5 et une augmentation de l'apoptose de 10% dans la lignée U-CH1¹⁸⁴. En essai clinique de phase 1, la combinaison d'imatinib et de cyclophosphamide a induit la stabilisation de la maladie chez 3 patients présentant un chordome avancé sur 7¹⁸⁵. Un deuxième essai de phase 1 combinant de la radiothérapie à la molécule nilotinib chez 23 patients présentant des chordomes avancés non métastatiques a induit une réponse chez un de ces patients¹⁸⁶.

- *cMET*

In vitro, des miRNA (miRNA1, 34a et 608) ciblant cMET permettent de diminuer son expression, d'inhiber la croissance des cellules tumorales d'environ 40% dans la lignée U-CH1^{91,96}. Dans une étude portant sur l'efficacité des inhibiteurs d'EGFR, la lignée U-CH2 a présenté une forte résistance à ces inhibiteurs via l'activation de cMET. La combinaison de l'inhibiteur d'EGFR sapatinib à l'inhibiteur de cMET crizotinib induit une

inhibition de la croissance de ces cellules de 50%¹⁸¹. Aucun essai clinique utilisant un inhibiteur de cMET n'a été publié à ce jour.

- *VEGF*

In vitro, aucun inhibiteur de VEGF n'a été testé. Cependant, *in vivo*, la surexpression de VEGFR2 et d'EGFR induit un phénotype de chordome dans un modèle de zebrafish¹⁸⁷. Dans un essai clinique de phase II, 4 patients présentant des chordomes avancés sur 9 ont obtenu une maladie stable pour 16 semaines au moins après traitement à l'inhibiteur sunitinib¹⁸⁸. Dans une seconde étude évaluant l'efficacité du sorafenib chez 26 patients atteints de chordome, la survie sans progression à 9 mois était de 72,9%¹⁸⁹.

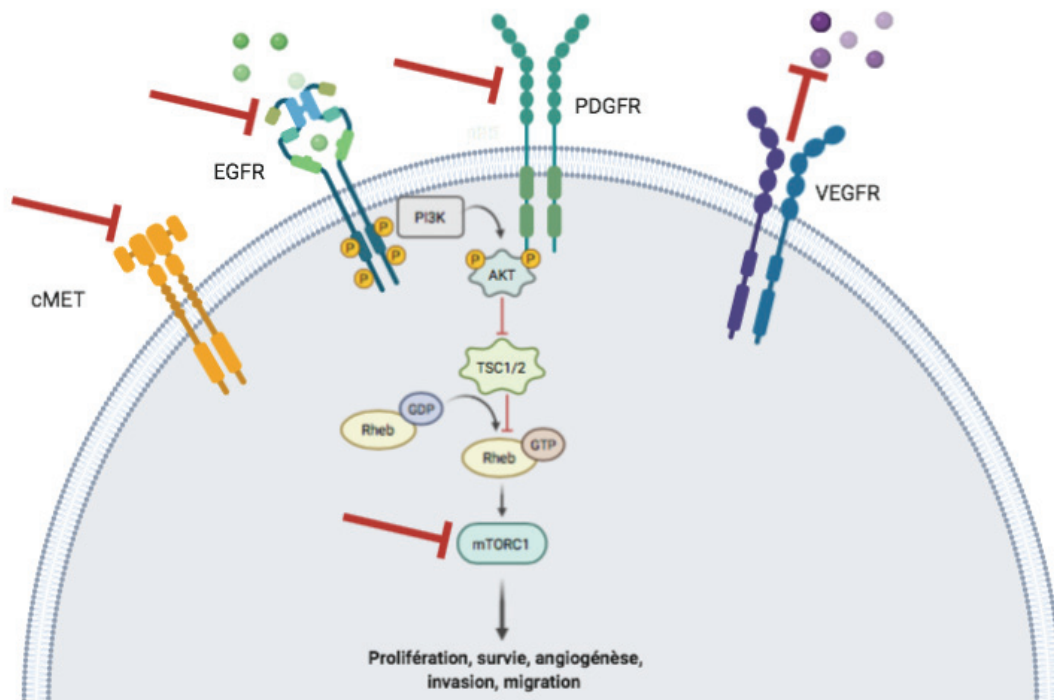


Figure 11- Cibles de thérapies émergentes dans le chordome-plusieurs inhibiteurs de récepteurs à tyrosine kinases et d'effecteurs de la voie PI3K/Akt ont été évalués dans le chordome. Les cibles principales sont : cMET, EGFR, PDGFR, VEGFR et mTORC1.

(B) La voie de signalisation PI3K/Akt mTOR

Les voie de signalisation phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt et mammalian target of rapamycin (mTOR) sont deux voies cruciales pour la croissance, la survie, la prolifération d'une cellule en conditions physiologiques comme en conditions pathologiques. Ces voies sont interconnectées et interagissent avec de nombreuses voies de signalisation

intracellulaires dans des processus variés. De nombreuses dérégulations de ces voies ont été observées dans les cancers. Dans le chordome, quelques études ont veillé à évaluer l'efficacité d'inhibiteurs de membres de ces voies. *In vitro*, le traitement de la lignée cellulaire U-CH1 avec un inhibiteur de mTOR (rapamycine) induit une diminution de la prolifération de ces cellules d'un facteur 10¹⁹⁰. L'inhibiteur de PI3K/mTOR PI-103 induit une augmentation du nombre de cellules apoptotiques d'un facteur 3 dans la lignée U-CH1¹⁹¹. *In vivo*, le traitement à la rapamycine de modèles murins de xenogreffes d'U-CH1 a montré une réduction du volume tumoral. En effet, après 4 cycles de traitement à la rapamycine, les oursis traités ont un volume tumoral de 100mm³ alors qu'il est de 200mm³ chez les souris non traitées¹⁹².

Un essai clinique de phase 2 a testé l'efficacité de la combinaison de l'imatinib et de l'everolimus chez 43 patients atteints de chordome à stade avancé. Neuf patients ont montré une réponse partielle, 24 une maladie stabilisée, et 7 ont vu leur maladie progresser¹⁹³.

(C) Les Cycline Dépendante Kinases (CDK)

L'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR induit la production de la cycline D et une activation du cycle cellulaire. La cycline dépendant kinase 4 (CDK4) et la cycline dépendant kinase 6 (CDK6) sont des sérine/thréonine kinases qui régulent la progression du cycle cellulaire. Les CDK4/6 se lient aux cyclines D pour accélérer le passage en phase S des cellules. Elles vont phosphoryler la protéine Rb permettant l'expression de gènes nécessaires à l'entrée en phase S. Dans le chordome, l'expression CDKN2A (p16), qui a physiologiquement le rôle d'inhiber la CDK4, est souvent perdue. Cette perte d'expression de p16 peut être à l'origine d'une surexpression de CDK4, qui devient une cible thérapeutique potentielle (Figure 12).

In vitro, l'inhibiteur palbociclib a une IC₅₀ située entre 50,2nM et 340nM pour les lignées U-CH2, U-CH3, U-CH6, U-CH7 et U-CH11¹⁰³. Un essai

clinique est en cours pour tester l'efficacité du palbociclib chez des patients atteints de chordomes avancés.

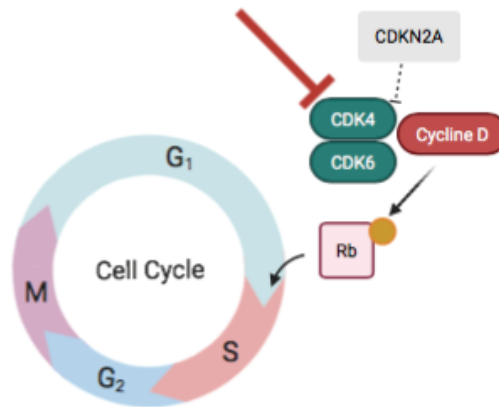


Figure 12-Inhibition des CDK4/6 dans le chordome- la CDK4 et la CDK6 induisent la phosphorylation de la protéine Rb et l'entrée en phase S du cycle cellulaire. L'efficacité de l'inhibiteur de CDK4/6 palbociclib a été évaluée dans le chordome.

(D) Vaccin brachyury

Brachyury semblant être un acteur majeur de l'oncogénèse du chordome, plusieurs vaccins ciblant cette protéine ont été développés. Un essai clinique de phase I incluant 11 patients présentant des chordomes avancés ou métastatiques a évalué l'efficacité d'un vaccin anti-Brachyury¹⁹⁴. Les résultats ont montré que 6 de ces patients ont une maladie stable après traitement. La survie sans progression à 6 mois était de 50%. Ces résultats encourageants ont mené à un essai clinique de phase II randomisé. Dans cet essai, 11 patients ont reçu un vaccin anti-Brachyury et 13 ont reçu un placebo. Malgré la production de cellules T ciblant brachyury chez l'ensemble des patients traités, les premiers résultats ne montrent pas de différences entre les deux groupes¹⁹⁵.

(E) Autres thérapies

D'autres approches thérapeutiques ont été testées dans le chordome, notamment des inhibiteurs de checkpoints immunitaires, des inhibiteurs de la protéine SMARCB1, et des inhibiteurs de TGF- β .

Tableau 9- Essais cliniques en cours dans le chordome

Titre de l'étude	Statut	Drogue	Phase	Nombre de participants	NCT
Phase 2 yeast Brachyury vaccine	active, not recruiting	vaccine, radiotherapy	2	55	NCT02383498
BN Brachyury and radiation in chordoma	active, not recruiting	BN Brachyury + radiations	2	29	NCT03595228
Afatinib in Locally Advanced and Metastatic Chordoma	recruiting	afatinib	2	40	NCT03083678
Immune Checkpoint Inhibitor Nivolumab in People with Select Rare CNS Cancers	recruiting	nivolumab	2	180 (pas que chordome)	NCT03173950
nivolumab with or without stereotactic radiosurgery in treating patients with recurrent, advanced, metastatic chordoma	recruiting	nivolumab/ stereotactic RS	1	33	NCT02989636
Nivolumab and Relatlimab in Treating Participants with Advanced Chordoma	recruiting	nivolumab, relatlimab	2	20	NCT03623854
A Phase II, Multicenter Study of the EZH2 Inhibitor Tazemetostat in Adult Subjects with INI1-Negative Tumors or Relapsed/Refractory Synovial Sarcoma	recruiting	tazemetostat	2	250 (pas que chordome)	NCT02601950
CDK4/6 inhibition in locally	recruiting	palbociclib	2	43	NCT03110744

advanced/metastatic chordoma					
---	--	--	--	--	--

Les thérapies ciblées semblent avoir un intérêt thérapeutique dans le chordome et nécessitent de nouvelles études pour sélectionner au préalable les patients qui pourraient en bénéficier.

PARTIE 3 MECANISMES D'ACTION DE LA RADIOThÉRAPIE, RADIORÉSISTANCE ET STRATÉGIES RADIOSENSIBILISANTES

La radiothérapie fait partie intégrante des traitements des chordomes. Cependant, ces tumeurs présentent une forte radiorésistance, d'où la nécessité de l'application de fortes doses induisant de la toxicité aux tissus alentours. Une stratégie contournant ce problème pourrait être l'amélioration de l'efficacité de la radiothérapie.

Ce chapitre exposera les mécanismes généraux de réponse à la radiothérapie et de radiorésistance des sarcomes et du chordome ainsi que les approches radiosensibilisantes développées.

I. Mécanismes d'action de la radiothérapie

1. Généralités

Un rayonnement est dit ionisant s'il possède une énergie suffisante ($>10\text{eV}$) pour ioniser une molécule d'eau¹⁹⁶. On distingue 2 grandes catégories de rayonnements ionisants : les faisceaux de particules (protons, neutrons, ions, particules α) et les ondes électromagnétiques (rayons X, rayons γ) (Figure 13). Ces rayonnements ionisants sont caractérisés par leur capacité à ioniser un tissu, que l'on appelle le transfert d'énergie linéaire (TEL). Dans le traitement des chordomes, les principaux rayonnements utilisés sont les rayons X (TEL faible) et les protons (TEL fort)^{197,198}.

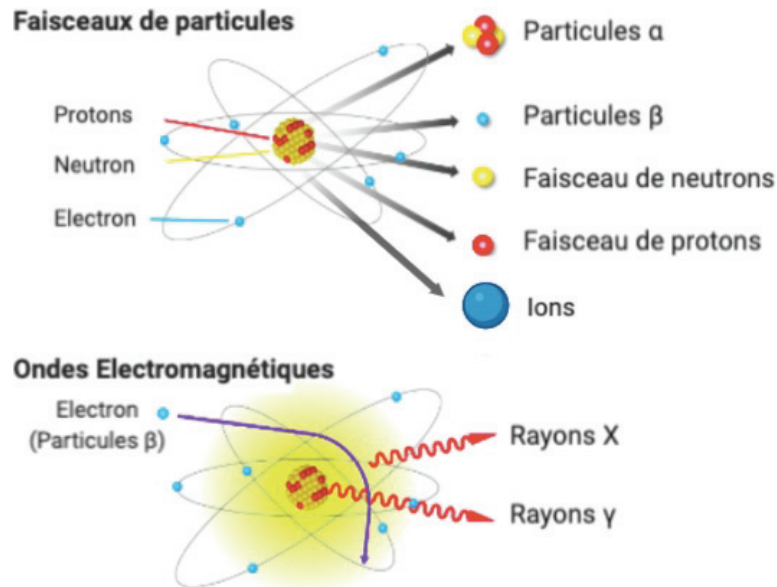


Figure 13- Les différents types de rayonnements ionisants- On distingue 2 grandes catégories de rayonnements ionisants : les faisceaux de particules (protons, neutrons, ions, particules α) et les ondes électromagnétiques (rayons X, rayons γ).

2. Effets biologiques des rayonnements ionisants

Bien qu'affectant l'ensemble des composants de la cellule, la cible principale des rayonnements ionisants est l'ADN (Figure 14). Deux types d'effets biologiques sont induits par les rayonnements ionisants : les effets directs et indirects.

Les effets directs sont caractérisés par l'ionisation directe et rapide de l'ADN par les rayonnements. En effet, un rayonnement va entraîner la formation de micro dépôts d'énergie à proximité des molécules d'ADN qui vont déstabiliser leurs structures et entraîner des dommages.

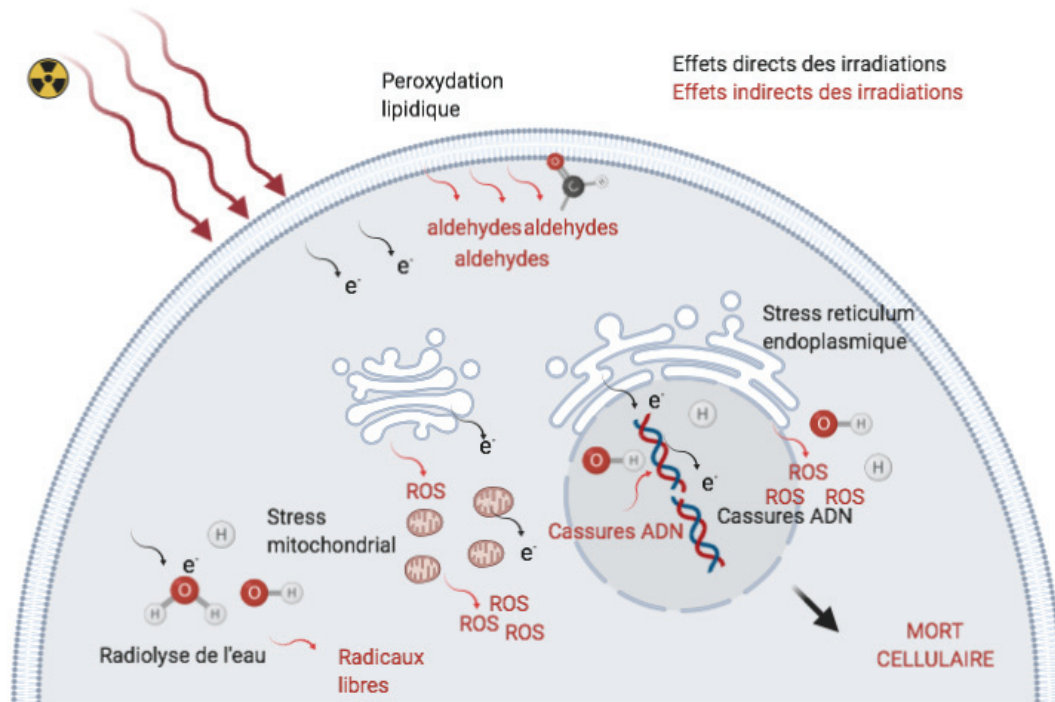


Figure 14- Résumé des effets directs et indirects d'une irradiation-les effets directs sont caractérisés par la formation de micro dépôts proches de l'ADN qui vont entraîner des cassures. Les effets indirects sont caractérisés par la radiolyse de l'eau qui entraîne la formation d'espèces oxygènes réactives qui vont aller réagir avec les ROS produits par chacun des compartiments cellulaires et augmenter le nombre de cassures.

Les effets indirects sont plus tardifs et sont médiés par un phénomène chimique : la radiolyse de l'eau (Figure 15). Les molécules d'eau ionisées par les rayonnements vont former des espèces chimiques à fort pouvoir oxydant (hydroxyles, superoxydes, etc). Ces espèces chimiques réagissent alors avec les molécules à proximité et induisent des dommages supplémentaires dans l'ADN¹⁹⁹.

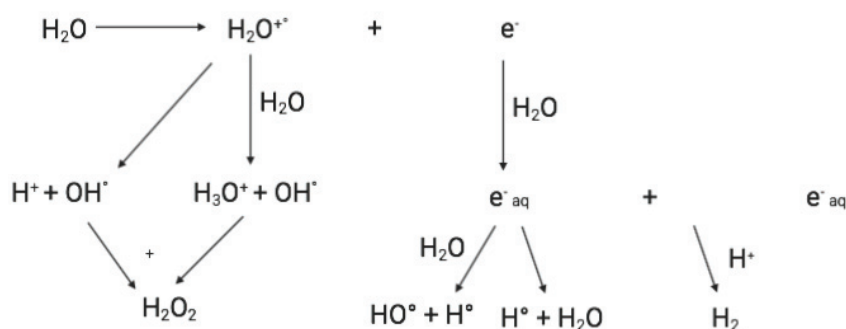


Figure 15-Radiolyse de l'eau.

Les rayonnements de haut TEL (protons) induisent principalement des effets directs alors que pour les rayonnements de faible TEL, un ratio actions indirectes/directes d'environ 3:1 s'établit^{200,201}.

Les dommages induits dans l'ADN par un rayonnement ionisant regroupent les dommages de base (oxydation, pontage entre bases voisines, perte d'une base), les cassures simple brin, et les cassures double brin. Ces dommages ont différentes incidences en fonction de l'énergie déposée²⁰²¹⁹⁹. Le nombre de dommages à l'ADN induit par une dose de 1 Gy d'irradiations est résumé dans le Tableau 10. Les dommages à l'ADN sont ensuite pris en charge par la cellule via différents mécanismes de réparation dont l'efficacité et la vitesse varient.

Tableau 10-Les différents types de dommages radioinduits et leurs caractéristiques physiques, biochimiques et biologiques (N. Foray)

	Dommage de base	Cassure simple brin	Cassure double brin
Énergie déposée (rayons X)	>1eV/nm ³	>10eV/nm ³	>100eV/nm ³
Incidence	10 000/Gy	1000/Gy	40/Gy
Réparation (50%)	5-10 minutes	10-20 minutes	>50 minutes
Mécanisme de réparation	Excision Resynthèse	Excision Resynthèse Recombinaison	Suture Recombinaison

En conséquence, les cassures double brin sont les plus difficiles à réparer pour une cellule et sont les seules capables d'induire la mort cellulaire. Le paragraphe suivant est dédié à l'explication de la réponse d'une cellule cancéreuse à un rayonnement ionisant.

3. Mécanismes de réponse à un rayonnement ionisant

La réponse d'une cellule cancéreuse à un rayonnement ionisant se déroule en plusieurs étapes allant de la reconnaissance des dommages de l'ADN à l'induction de la mort cellulaire.

(A) La reconnaissance des dommages à l'ADN

Deux kinases, Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) et Ataxia Telangiectasia RAD3-related (ATR), reconnaissent les dommages à l'ADN et phosphorylent un grand nombre de protéines cibles impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. La kinase ATM reconnaît plus précisément les cassures double brin de l'ADN alors qu'ATR reconnaît les cassures simple brin et les problèmes de la fourche de réplication^{203,204}.

Une fois le dommage reconnu, ATM phosphoryle les protéines CHK1 et CHK2 (Checkpoint kinase 1 et 2). Les kinases ATM, CHK1 et CHK2 vont alors phosphoryler la protéine p53. Lorsqu'elle est phosphorylée, p53 se détache de la protéine MDM2 (mouse double minute 2 homolog) n'est plus dégradée par le protéasome, et se rend dans le noyau où elle va activer la transcription de nombreux gènes cibles impliqués dans la synthèse et la réparation de l'ADN, la sénescence, la plasticité du génome, etc²⁰⁵⁻²⁰⁷. P53 joue un rôle majeur dans le devenir d'une cellule post irradiation. Selon les modifications post-traductionnelles que la protéine p53 possède, elle va activer des gènes entraînant soit la mort cellulaire, soit l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (Figure 16)²⁰⁸.

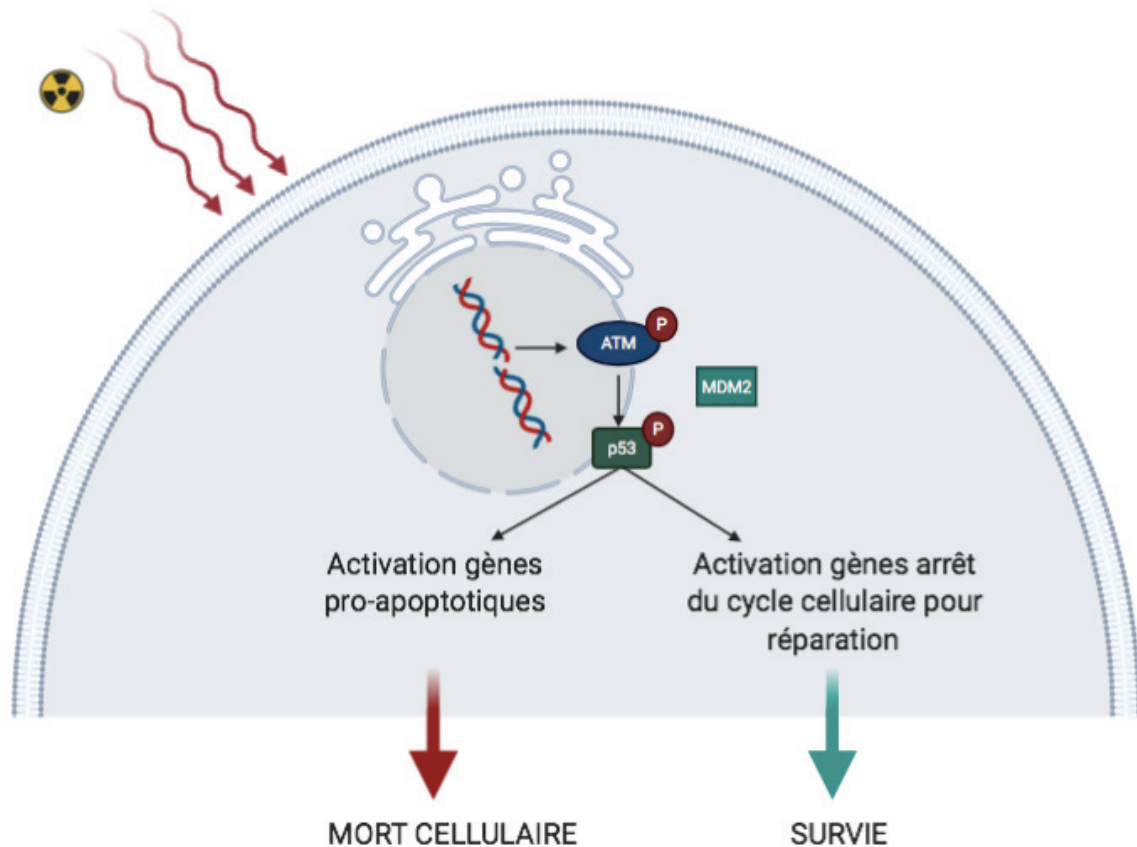


Figure 16-Reconnaissance des dommages à l'ADN par ATM et activation de p53-Une fois les dommages à l'ADN reconnus par la kinase ATM, elle va activer la protéine p53, qui, selon les modifications post-traductionnelles qu'elle porte choisit entre l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN ou la mort cellulaire. S'il reste des erreurs après la réparation de l'ADN, p53 va pouvoir également entraîner la mort cellulaire à ce moment-là.

(B) L'arrêt du cycle cellulaire

Lorsque p53 oriente la cellule vers l'arrêt du cycle cellulaire, elle induit la transcription de la protéine p21 (Figure 17). A son tour, p21 va inhiber les CDK4 et 6 et entraîner un arrêt de la cellule en phase G1 du cycle cellulaire²⁰⁹. P21 peut aussi inhiber CDK1 induisant un arrêt en phase G2 du cycle cellulaire²¹⁰. Les protéines CHK1 et CHK2 peuvent aussi phosphoryler la protéine CDC25 (cell division cycle 25), une phosphatase impliquée dans l'activation des CDK1 et 2 par déphosphorylation. La phosphorylation de CDC25 inhibe la déphosphorylation des CDK1 et 2 et induit un arrêt en phase G2 ou G1 du cycle cellulaire, respectivement²¹¹. L'arrêt du cycle cellulaire va permettre à la cellule de réparer son ADN.

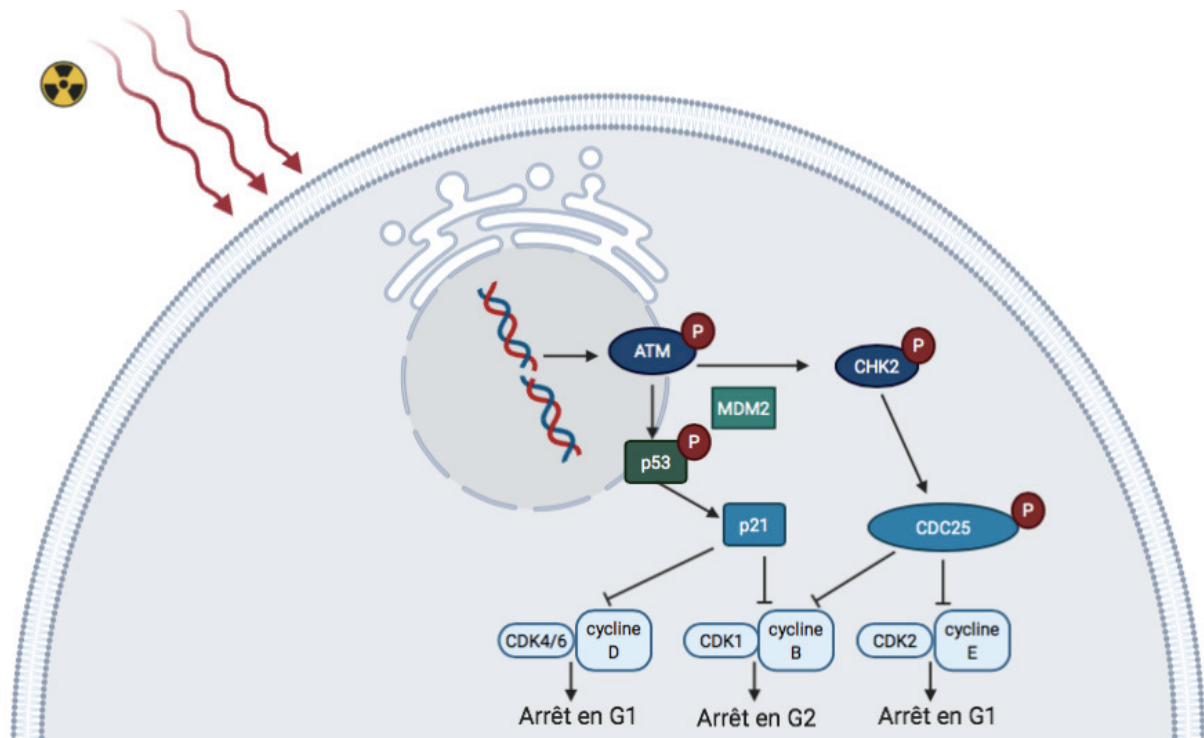


Figure 17-Arrêt du cycle cellulaire suite à un dommage dans l'ADN- Les dommages à l'ADN sont reconnus par la kinase ATM qui phosphoryle p53. P53, actif, active à son tour p21 qui est capable d'inhiber les CDK1, 4 et 6 permettant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et G2. ATP peut aussi phosphoryler CHK2, qui à son tour phosphoryle CDC25. CDC25 est capable d'inhiber l'activation des CDK1 et 2, provoquant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou G2.

(C) La réparation de l'ADN

Les cassures double brin étant létales pour la cellule, elle va essayer de les réparer. Pour cela, deux voies principales de réparation des cassures doubles brins existent : la jonction d'extrémité non homologue (NHEJ) ou la recombinaison homologue (RH). La NHEJ intervient plus fréquemment pendant la phase G1 du cycle cellulaire et relie les 2 extrémités de l'ADN cassé, entraînant un grand nombre d'erreurs (Figure 18).

La NHEJ débute par la reconnaissance de la cassure double brin par l'hétérodimère Ku70-Ku80. Ce complexe bloque l'extrémité 5' de l'ADN et maintient les extrémités de l'ADN proches afin de les relier. Il est aussi responsable de l'activation de la protéine 53BP1 qui protège les extrémités de l'ADN cassé. La phosphorylation de la protéine H2AX (γ H2AX) par ATM intervient également dans la stabilisation des extrémités de l'ADN. Par la suite, la machinerie de réparation s'assemble avec les protéines PPRKDC,

Artemis et les extrémités de l'ADN sont reliées par les ligases LIG4, XRCC4 et XLF²¹².

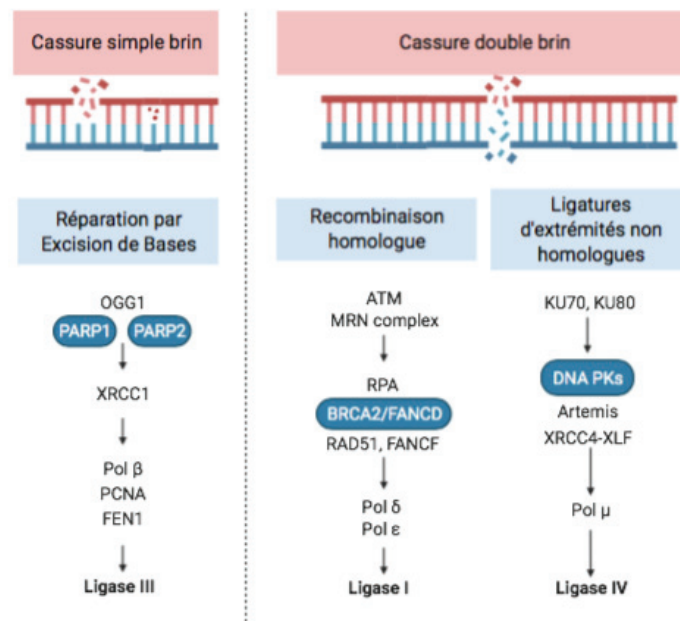


Figure 18-Réparation de l'ADN après une cassure simple ou double brin- Lors d'une cassure dans l'ADN, différents mécanismes de réparation de la cellule existent. Pour les cassures simples brins, la réparation par excision et resynthèse de base est souvent utilisée, avec les PARP1 et 2 et la protéine XRCC1 comme acteurs principaux. Lors d'une cassure double brin, les mécanismes de recombinaison homologue ou de ligatures d'extrémités non homologues sont utilisés pour réparer l'ADN cassé.

La RH intervient uniquement lors des phases S tardives et G2 du cycle. Ce mode de réparation prend en modèle la chromatide sœur pour resynthétiser un brin d'ADN identique et le relier au reste de l'ADN (Figure 18). Ce système de réparation est donc beaucoup plus précis²¹³.

Lors d'une réparation par RH, le complexe MRN composé des protéines MRE11, RAD50 et NBS1 repère la cassure double brin et initie la résection des extrémités de l'ADN en collaboration avec la protéine CTIP. RAD51 permet alors la formation d'une boucle avec la chromatide sœur. L'ADN polymérase réplique l'ADN et des ligases vont relier les extrémités de l'ADN au brin cassé²¹⁴.

Une fois la réparation terminée, si l'ADN est réparé convenablement, le cycle cellulaire reprend son cours. Cependant, si l'ADN n'est pas réparé

correctement, les voies de mort cellulaire par apoptose ou cassure mitotique sont activées.

(D) La mort cellulaire

- L'induction de l'apoptose

En réponse à un rayonnement ionisant, la voie intrinsèque de l'apoptose peut être induite de plusieurs façons : soit par activation de p53 ou par accumulation de ROS. P53 peut choisir la voie de la mort cellulaire directement (Figure 16) ou suite à la mauvaise réparation des dommages à l'ADN et activer des gènes pro-apoptotiques conduisant à la mort cellulaire (Figure 19)²¹⁵. La protéine p53 est capable d'activer les récepteurs de mort de la super famille des TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor). L'activation de ces récepteurs déclenche la cascade de signalisation de l'apoptose extrinsèque et conduit à la mort de la cellule (Figure 19)²¹⁶⁻²¹⁸.

- L'induction de l'apoptose par les ROS

L'accumulation de ROS peut également entraîner une perte du potentiel de membrane mitochondrial induisant le relargage du cytochrome c conduisant à la mort cellulaire^{219,220,221}.

Les ROS produits lors d'une irradiation entraînent des dommages lipidiques. Lors d'un dommage lipidique, la sphingomyélinase est activée et vient hydrolyser la sphingomyéline, ce qui entraîne la libération de céramide. La céramide libérée entraîne l'activation de la des Caspases 1, 3 et 6, entraînant la mort de la cellule^{222,223}.

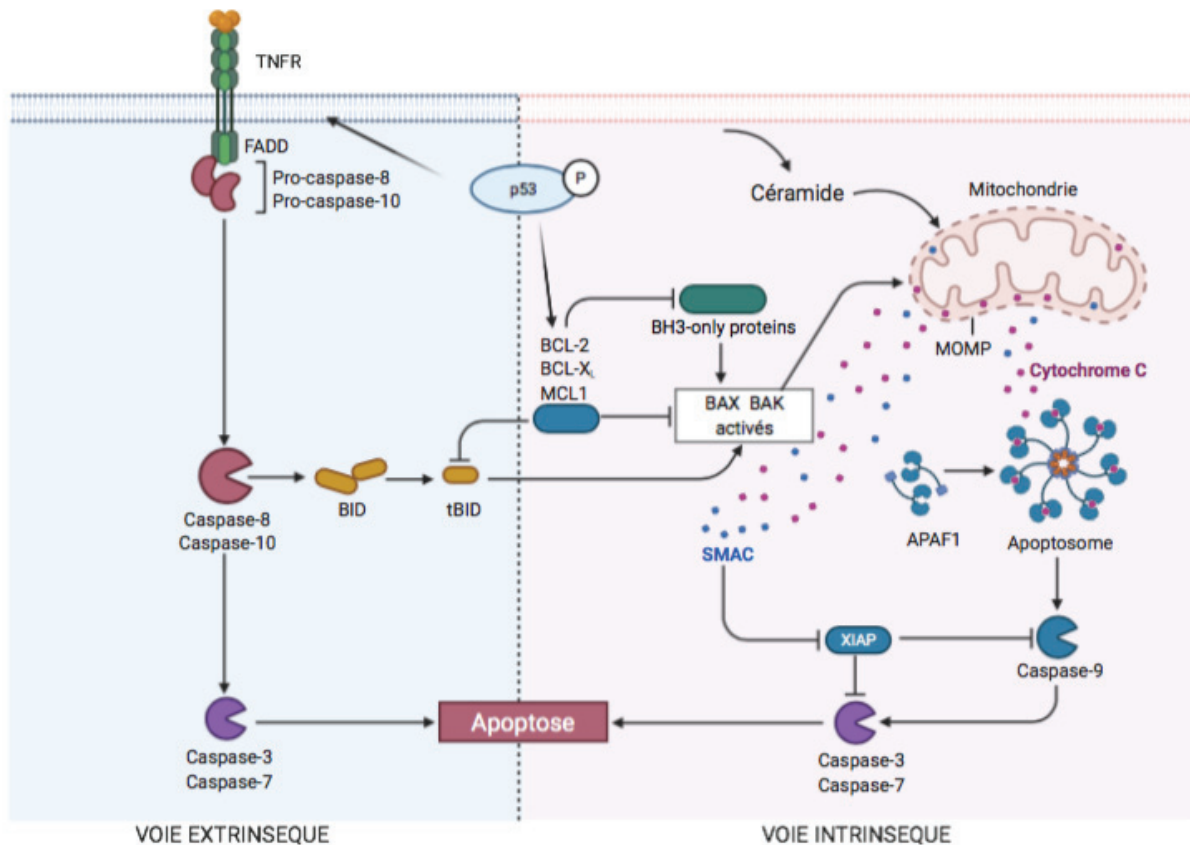


Figure 19-Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose induites par les radiations

- L'induction de la mort par catastrophe mitotique

Une mauvaise réparation de l'ADN suite à un rayonnement peut induire une catastrophe mitotique. La catastrophe mitotique est due à la mauvaise condensation des chromosomes et à l'entrée en mitose des cellules avant la fin des phases S et G2 du cycle cellulaire^{224,225}.

Ainsi, en réponse aux rayonnements ionisants, les cellules cancéreuses déclenchent des mécanismes de reconnaissance des dommages à l'ADN pouvant conduire à leur réparation et à la survie de la cellule ou à leur mort. Cependant, ces cellules peuvent présenter des dérèglements les rendant intrinsèquement résistantes aux effets des rayonnements.

II. Mécanismes de radiorésistance des cellules cancéreuses

On distingue deux types de radiorésistance, la radiorésistance intrinsèque et la radiorésistance acquise suite à l'action d'un rayonnement ionisant. La radiorésistance intrinsèque correspond aux propriétés intrinsèques de la cellule à résister à la mort cellulaire induite par un rayonnement. La radiorésistance acquise correspond au développement de nouvelles propriétés par la cellule lui permettant de résister à l'action des rayonnements. Très peu d'études se sont intéressées aux causes de la radiorésistance dans le chordome et décrivent l'implication de propriétés intrinsèques à cette tumeur.

La radiorésistance étant une caractéristique commune aux sarcomes, cette partie résumera les principales causes de radiorésistance dans les sarcomes puis introduira les hypothèses quant à la radiorésistance des chordomes.

1. Mécanismes de radiorésistance des sarcomes

(A) Rôle du cycle cellulaire

Dans les sarcomes, la radiorésistance peut être liée au défaut de cycline dépendante kinases qui jouent un rôle crucial dans l'arrêt du cycle cellulaire et permettant la réparation de l'ADN (Figure 20). Dans le chondrosarcome, des délétions de RB1 (1/4 des patients) et de CDKN2A (3/4) ont été retrouvés dans les échantillons de patients. De plus, une mutation de CDKN2A est aussi présente dans la lignée SW1353, la plus radiorésistante des lignées cellulaires utilisées dans cette étude²²⁶. Dans l'ostéosarcome, une forte expression de la protéine CRIF a été retrouvée chez les patients. L'inhibition de l'expression de CRIF dans les lignées cellulaires d'OS induisent une diminution de leur radiorésistance. La protéine CRIF phosphoryle CDK2, ce qui favorise l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN et améliore donc l'efficacité des cellules à répondre à un rayonnement²²⁷. Dans le rhabdomyosarcome, la comparaison de lignées radiorésistantes à des lignées radiosensibles a mis en évidence un mécanisme de radiorésistance. Les cellules radiorésistantes sont capables

de reprendre leur cycle cellulaire plus rapidement après un rayonnement leur permettant d'éviter la mort cellulaire induite par les dommages à l'ADN²²⁸.

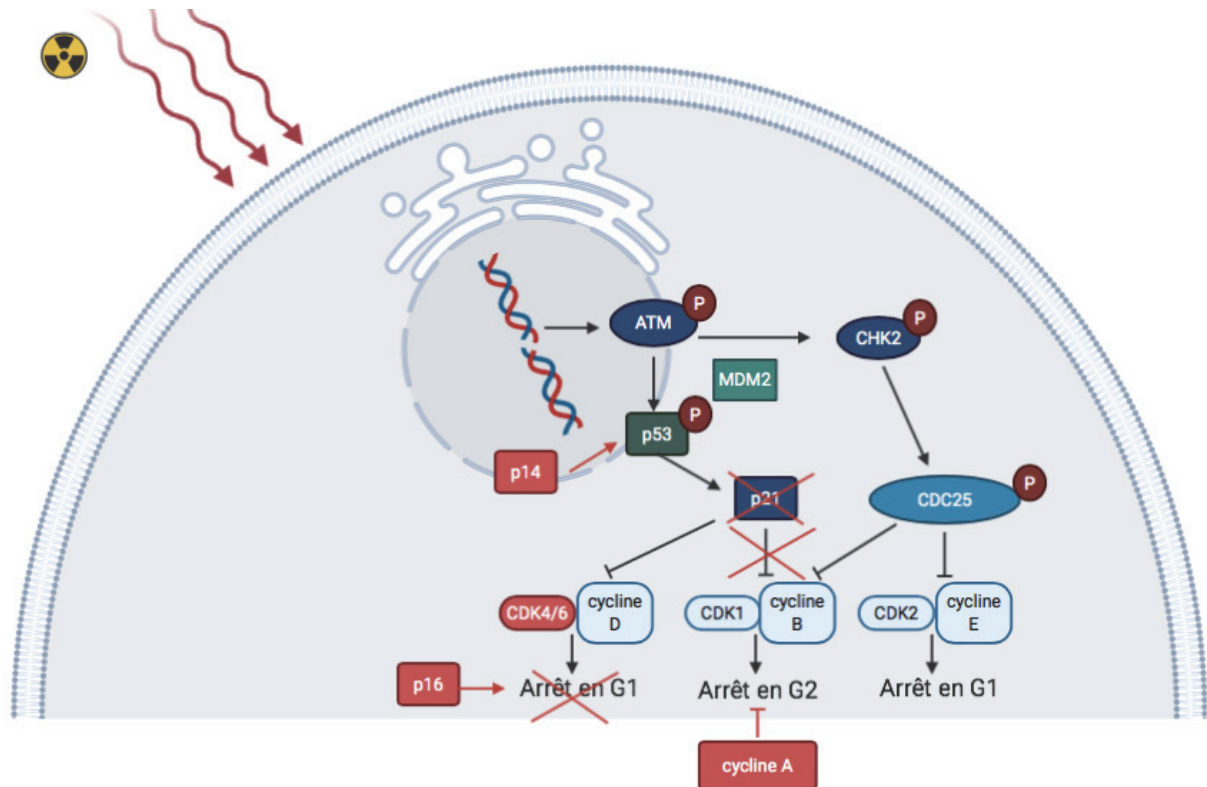


Figure 20- Radiorésistance liée à des déficiences du cycle cellulaire- des altérations dans les acteurs de la régulation du cycle cellulaire sont à l'origine de radiorésistance. Les protéines principalement touchées sont p14, p16, p21 les CDK et la cycline A.

(B) Rôle de p53

Le gène TP53 est muté dans environ 50% des tumeurs²²⁹. Dans les sarcomes, des mutations affectant la fonction normale de p53 sont retrouvées dans 80% des ostéosarcomes, 20% des chondrosarcomes, 10% des sarcomes d'Ewing et 15% des rhabdomyosarcomes²³⁰. Ces mutations affectent principalement la protéine MDM2 que l'on retrouve amplifiée augmentant la dégradation de p53, mais peuvent aussi affecter p53 directement avec les mutations non-sens les plus fréquemment retrouvées. Ces mutations sont impliquées dans la radiorésistance du fait de la dégradation excessive de la protéine ou du fait de la perte de l'activité

normale de p53 empêchant l'activation de la voie de la mort cellulaire (cf paragraphe précédent) ^{231,232}.

(C) Rôle de la réparation à l'ADN

Les cellules cancéreuses résistantes aux radiations présentent généralement une machinerie de réparation de l'ADN plus efficace. Une étude portant sur 5 lignées de sarcomes différents (fibrosarcome, liposarcome, sarcome synovial, rhabdomyosarcome et ostéosarcome) a mis en évidence une corrélation entre le niveau de radiorésistance de ces lignées et l'expression de sept protéines impliquées dans la réparation des cassures double brin de l'ADN. Les protéines présentant la corrélation la plus forte sont les kinases ATM, ATR et NBS. En effet, les lignées les plus radiorésistantes (fibrosarcome, liposarcome) ont une expression basale plus élevée de ces trois protéines que les lignées les plus radiosensibles²³³. Ces résultats démontrent l'implication du système de réparation des cassures double brin dans la radiorésistance.

(D) Rôle de la mort cellulaire

Les cellules cancéreuses possèdent des mécanismes de blocage de la mort cellulaire. Dans les sarcomes, de nombreux défauts de la mort cellulaire par apoptose ont été observés²³⁴. Leur lien avec la radiorésistance a été étudié dans le chondrosarcome. En effet, l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-XL et XIAP est plus élevée dans deux lignées cellulaires de chondrosarcome en comparaison à deux lignées cellulaires de chondrocytes normaux. Lorsque l'expression de ces protéines anti-apoptotiques a été inhibée par siRNA, une augmentation de la radiosensibilité d'un facteur 10 a été observé dans les lignées de chondrosarcome²³⁵. Dans le sarcome d'Ewing, l'application de rayons X à des doses de 2 à 10 Gy induit une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique survivine de manière dose-dépendante. De plus, son inhibition par siRNA induit une augmentation de la mort par apoptose d'un facteur 2²³⁶.

(E) Rôle de l'hypoxie

Les sarcomes, comme l'ensemble des tumeurs solides, présentent des zones d'hypoxie²³⁷⁻²⁴⁰. Une étude sur 33 patients présentant des sarcomes de tissus mous de haut grade non métastatiques a démontré une corrélation entre taux d'oxygène tumoral et rechute²⁴¹. En effet, les 8 patients de cette étude présentant une rechute ont un taux d'oxygène beaucoup plus faibles que ceux dont la maladie s'est stabilisée. De plus, une seconde étude a démontré une corrélation entre une faible oxygénation tumorale et le développement de métastases. En effet, dans cette étude, les patients présentant des métastases avaient une pression partielle en oxygène (pO_2) moyenne de 7,5mmHg alors que celles de patients dont la maladie s'est stabilisée, une pO_2 de 20mmHg²⁴². Ces zones d'hypoxie représentent aussi des éléments prédictifs d'une mauvaise réponse à la radiothérapie dans de nombreux sarcomes²⁴³⁻²⁴⁶. Différents mécanismes ont été suggérés pour expliquer ce lien entre hypoxie et radiorésistance²⁴⁷.

(i) L'inhibition des effets indirects de la radiothérapie

Les effets indirects des radiations sont décrits dans le paragraphe précédent. En présence d'oxygène, la production d'espèces réactives induites par un rayonnement ionisant est amplifiée. Cela entraîne des dommages supplémentaires dans l'ADN qui induiront la mort cellulaire plus rapidement. En l'absence d'oxygène, cette boucle d'amplification de la production d'espèces réactives est inhibée, ce qui peut contribuer à la radiorésistance²⁴⁸.

(ii) L'implication du facteur de transcription HIF-1 α :

En condition hypoxique, le facteur de transcription HIF-1 α s'accumule et dimérise avec la sous-unité HIF-1 β pour favoriser la transcription de leurs gènes cibles. HIF-1 régule la transcription de centaines de gènes et induit la radiorésistance en agissant par de multiples mécanismes²⁴⁹. A titre

d'exemples, HIF-1 induit la radiorésistance en altérant le métabolisme cellulaire. HIF-1 favorise notamment la glycolyse en stimulant l'expression de GLUT-1 (transporteur de glucose) dans le rhabdomyosarcome et le sarcome d'Ewing²⁵⁰. Dans un modèle de souris de rhabdomyosarcome, la délétion de HIF-1 α entraîne une radiosensibilisation via des changements métaboliques²⁵¹.

(iii) L'implication du métabolisme antioxydant

L'hypoxie fait augmenter le taux de ROS intracellulaires, permettant de stimuler le métabolisme antioxydant pour détoxifier la cellule²⁵²⁻²⁵⁴. Brièvement, le système antioxydant d'une cellule repose sur l'activité de différentes enzymes : la superoxide dismutase (SOD), la glutathione peroxidase (GPX), la thioredoxine (TRX), le glutathion (GSH) et les peroxiredoxines (PRX)²⁵⁵. Dans une étude regroupant 35 ostéosarcomes et 20 sarcomes d'Ewing, la radiothérapie n'induit pas d'augmentation du niveau de stress oxydatif²⁵⁶. Or on sait que la radiothérapie induit la production de ROS qui sont censés augmenter le stress oxydatif. Si le niveau de stress oxydatif reste constant, les cellules tumorales sont capables d'augmenter leur système antioxydant pour contrecarrer l'action de la radiothérapie. Cette hypothèse a été confirmée dans le rhabdomyosarcome, où une étude montre l'augmentation de l'expression des enzymes antioxydantes SOD-2, CAT, et GPX après un traitement par radiothérapie permettant un retour rapide du niveau de ROS à l'état basal²⁵⁷.

(F) Rôle des cellules souches cancéreuses

Différentes sous-populations cellulaires cohabitent au sein des tumeurs. Il est maintenant bien établi qu'une de ces sous-populations correspond aux cellules cancéreuses de types souches (CSC)^{258,259}. Leur présence a été détectée dans l'ensemble des sarcomes osseux et sarcomes des tissus mous et est associée à un mauvais pronostic ainsi qu'à la résistance aux

traitements^{260,261}. Par exemple, des patients présentant un sarcome des tissus mous à hauts risques et moins bon pronostic vital ont une expression des gènes associés au phénotype souches 15,5 fois plus élevée que ceux présentant un sarcome à faible risque²⁶².

Ces cellules sont caractérisées par des propriétés particulières : une forte tumorigénicité, des capacités d'initiation tumorale, de migration, d'invasion ainsi qu'une activité aldéhyde déshydrogénase élevée et l'expression de différents marqueurs mésenchymateux (Nanog, Oct4, Sox...) ²⁶³. Elles sont aussi impliquées dans la résistance à la radiothérapie via différents mécanismes (Figure 21). En effet, la survie des CSC est favorisée par l'expression des voies de signalisation spécifiques (Wnt, Notch, Hh)^{264,265,266}. La surexpression de la survivine leur permet de résister à l'apoptose²⁶⁸. De plus, elles présentent fréquemment des capacités augmentées de réparation de l'ADN^{264,267,272}. Enfin, des cellules souches peuvent se nicher dans les zones hypoxiques tumorales, ce qui leur permet d'augmenter leur système anti oxydant et de rester quiescentes, favorisant leur résistance aux radiations²⁷⁶. Ainsi, les cellules souches cancéreuses possèdent des capacités intrinsèques leur permettant de résister aux radiations et de reformer une tumeur après traitement.

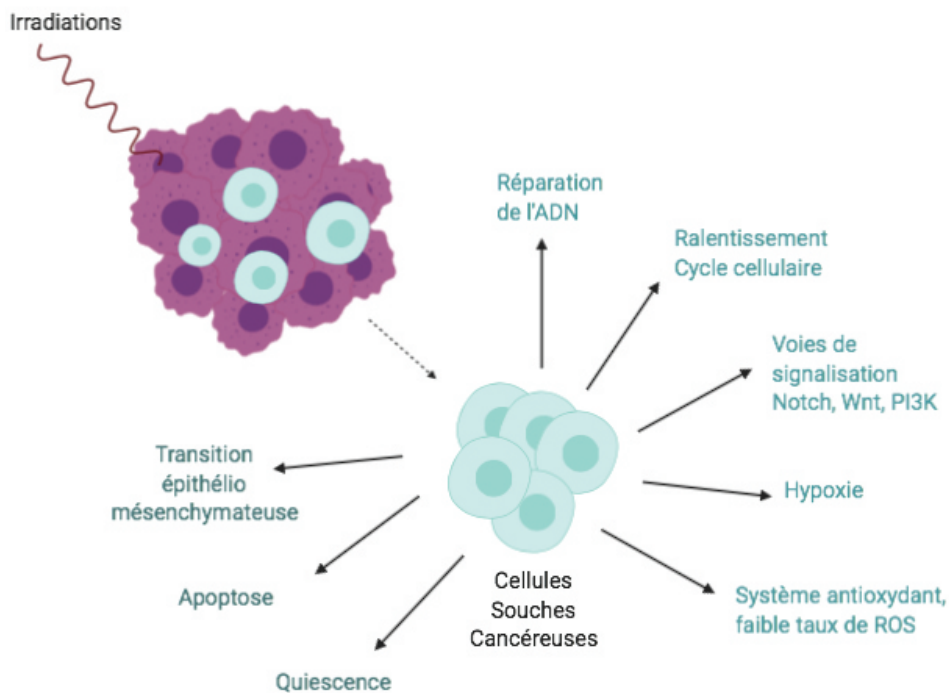


Figure 21- Mécanismes de résistance aux radiations des cellules souches cancéreuses- les CSC présentent des capacités intrinsèques leur permettant de résister aux radiations telles que : le ralentissement du cycle cellulaire, l'expression de voies de signalisation de survie, l'hypoxie leur permettant d'augmenter leur système anti oxydant, l'inhibition de voies apoptotiques et l'augmentation des capacités de réparation à l'ADN.

Les mécanismes de radiorésistance décrits dans les sarcomes peuvent nous aider à décrypter ceux du chordome.

2. Mécanismes de radiorésistance dans le chordome

Dans le chordome, très peu de mécanismes de radiorésistance ont été décrits. Ce paragraphe présentera donc des hypothèses de mécanismes de radiorésistance.

(A) Rôle du cycle cellulaire

Tout d'abord, il est important de souligner que les chordomes sont des tumeurs à croissance lente, possédant très peu de cellules en phase de mitose. Ces cellules en division étant les plus affectées par la radiothérapie, le chordome est donc intrinsèquement résistant à ce type de traitement. De plus, une étude portant sur le séquençage du génome complet de 4 chordomes a révélé une duplication fréquente du gène codant pour la

CDK4²⁷⁷. Une seconde étude a démontré que l'expression de CDK4 est corrélée à une augmentation de l'index de prolifération et à une moins bonne survie²⁷⁸. Or CDK4 est impliquée dans la reprise du cycle cellulaire en phase S, ce qui pourrait permettre au chordome de résister à l'arrêt du cycle cellulaire induit par les radiations.

De plus, le locus CDKN2 est souvent délété chez le patient⁶⁴. Il contient le gène CDKN2A qui code pour les protéines p16 et p14. P16 est impliquée dans le blocage de la progression du cycle cellulaire (transition G1/S) et p14 est notamment impliquée dans la stabilisation de p53²⁷⁹. Ces altérations pourraient expliquer la faible sensibilité des chordomes aux radiations.

(B) Rôle de p53

Une étude de séquençage du génome entier effectuée sur 63 échantillons de chordome a démontré que seul un patient possédait une mutation non-sens dans le gène TP53⁷². Si le gène TP53 n'est que rarement muté dans les chordomes, une expression accrue de la protéine p53 a été corrélée à la rechute des chordomes et à un mauvais pronostic^{280,281}. En effet, une étude a montré que 9 patients sur 10 présentant des rechutes exprimaient p53 alors qu'aucun des patients dont la maladie s'était stabilisée n'exprimaient cette protéine. D'autres études sont donc nécessaires pour vérifier que p53 n'est pas impliquée dans la radiorésistance du chordome.

(C) Rôle de la réparation à l'ADN

Dans le chordome, une étude a démontré une expression augmentée des protéines pATM, pATR, γ H2AX et RAD51 dans 26 chordomes en comparaison aux tissus sains adjacents²⁸². Les chordomes développeraient donc des capacités de réparation de l'ADN accrue qui leur donneraient un avantage face à une irradiation. De plus, une augmentation de l'expression de ces mêmes protéines a été retrouvée dans les lignées cellulaires U-CH1 et U-CH2 en réponse à une irradiation de 1 à 2 Gy, démontrant l'activation des voies de la réparation de l'ADN²⁸².

Cet avantage est perdu dans les chordomes avancés. En effet, dans une étude comportant 11 échantillons de chordome avancés, la voie de la recombinaison homologue est défectueuse²⁸³. Cela signifie que les tumeurs avancées perdent leur capacité à réparer les cassures double brin via la RH, ce qui constitue une faiblesse intéressante à exploiter.

(D) Rôle de la mort cellulaire

Dans le chordome, même si leur lien potentiel avec la radiorésistance n'a pas encore été élucidé, plusieurs anomalies des voies de l'apoptose ont été observées. Une étude mentionne la perte d'expression des récepteurs de mort TNFSFR9 et 14 dans les chordomes (chez 6 patients sur 8) alors qu'elle est présente dans les *nucleus pulposus* de disques intervertébraux sains⁸⁷.

(E) Rôle de l'hypoxie

Une forte expression du facteur de transcription HIF-1 α est retrouvée au sein des chordomes. Cette expression est corrélée à l'expression de VEGF et de MMP-2 et au nombre de vaisseaux rencontrés^{284,285}. De plus, la présence de zones d'hypoxie a été corrélée à un mauvais pronostic. En effet, 66% des patients chordome ayant développé des rechutes présentaient des zones tumorales hypoxiques contre 28% des patients ayant une maladie stable. D'autres études sont nécessaires pour étudier le lien entre hypoxie et radiorésistance dans le chordome.

(F) Rôle des cellules souches cancéreuses

Dans le chordome, une étude datant de 2012 a mis en avant la présence de cellules de type souche à la fois dans des tumeurs et dans la lignée cellulaire U-CH1²⁸⁶. Ces cellules seraient caractérisées par l'expression de c-myc, SSEA-1, Oct4, Klf4, Sox2 et Nanog et par les marqueurs CD133 et CD15. L'isolation des cellules CD133+, CD15+ au sein de la lignée U-CH1 a permis de montrer que ces cellules ont une meilleure capacité d'initiation tumorale et d'autorenouveaulement²⁸⁶. Depuis, d'autres études ont décrit ce

type de cellules au sein de différentes lignées et ont affiné leurs caractérisations (JHC7, UM-Chor1, U-CH1, U-CH2, MUG-Chor1)^{101,121,287-290}. En effet, en plus des marqueurs CD15 et CD133, les cellules souches de chordome expriment CD24 et ont une forte activité Aldéhyde Déshydrogénase²⁸⁷⁻²⁸⁹. Les cellules CD133+/CD15+ des lignées U-CH1 et MUG-Chor1 ont aussi des capacités d'invasion et de migration augmentées par rapport aux cellules CD15-/CD133-²⁸⁹.

Aucune étude n'a reporté de lien entre la présence de cellules souches et la résistance aux traitements. Cette relation est cependant bien étudiée dans les autres cancers.

Aujourd'hui, très peu d'informations sont disponibles au sujet des mécanismes de radiorésistance dans le chordome alors qu'ils commencent à être bien décrits dans les autres sarcomes. L'inhibition des acteurs principaux de ces voies de résistance pourraient rétablir la sensibilité aux radiations et améliorer le traitement de ces tumeurs. Cependant, pour l'instant, aucune étude clinique ne reporte l'utilisation de stratégies radiosensibilisantes dans le chordome. Néanmoins, des combinaisons de traitements systémiques à la radiothérapie ont déjà été évaluées dans les sarcomes.

3. Combinaisons de traitements systémiques à la radiothérapie :

L'efficacité de la radiothérapie en combinaison avec d'autres thérapies systémiques a été évaluée dans différents essais cliniques dans les sarcomes, essentiellement des tissus mous. Deux types de composés ont été évalués : la chimiothérapie (ifosfamide, doxorubicine) et des inhibiteurs de RTK (pazopanib). Des exemples d'étude seront rapportés dans ce paragraphe pour illustrer la faisabilité de combiner la radiothérapie à une thérapie systémique.

(A) Combinaison radiothérapie/chimiothérapie :

Une étude de phase I-II incluant 5 patients présentant des sarcomes rétropéritonéaux a évalué l'efficacité de la combinaison d'ifosfamide et de radiothérapie. Avant chirurgie, aucune différence d'efficacité n'a été observée entre le groupe traité uniquement par radiothérapie et le groupe traité par radiothérapie + ifosfamide. Une seconde étude englobant 115 patients présentant des sarcomes avancés ou métastatiques a évalué l'efficacité de la combinaison doxorubicine et radiothérapie. Une réponse a été observée chez 67% des patients avec 11% de réponse complète et 56% de réponse partielle, démontrant une efficacité de ce traitement.

(B) Combinaison à un inhibiteur de RTK

Un essai clinique de phase II a évalué la combinaison de chimiothérapie (ifosfamide et doxorubicine) et de radiothérapie avec ou sans l'inhibiteur de RTK pazopanib, chez 81 patients atteints de sarcomes des tissus mous. Le pourcentage de nécrose intratumorale obtenu après ajout de pazopanib à la combinaison était de 58,3% alors qu'il n'était que de 22,2% chez le groupe traité seulement avec la combinaison chimio- et radio-thérapies. La combinaison au pazopanib était donc plus efficace que la combinaison chimio radiothérapies seules.

Ces études montrent la faisabilité d'une combinaison d'une thérapie systémique à la radiothérapie dans les sarcomes. Cependant, cibler des acteurs impliqués dans la radiorésistance pourrait nettement améliorer les réponses observées. Dans les chordomes, quelques combinaisons de thérapies systémiques à la radiothérapie ont été évaluées ou sont en cours d'essais cliniques.

4. Combinaisons à la radiothérapie dans le chordome :

Dans le chordome, l'inhibiteur de PARP olaparib a été testé chez un patient présentant un chordome avancé. Si le traitement a été bien toléré et la

progression de la maladie diminuée au cours des 5 premiers mois suivant le traitement, la maladie a continué à progresser au bout du 10^{ème} mois post-traitement, démontrant l'acquisition d'une résistance à ce traitement par la tumeur²⁸³.

L'hyperthermie thérapeutique est connue pour induire des ROS qui pourraient augmenter les effets induits par la radiothérapie. Dans une étude portant sur 5 chordomes sacrés larges inopérables, la combinaison d'hyperthermie et de proton thérapie fractionnée a montré des réponses objectives (rétrécissement tumoral médian : 46%) chez chacun des patients mais de fortes douleurs locales, pouvant aller jusqu'à des fractures iliaques^{173,291-293}. Dans le but d'améliorer le traitement des chordomes, une étude a évalué l'efficacité de la proton thérapie avec modulation d'intensité. La modulation de l'intensité a permis d'attribuer des doses plus fortes aux zones hypoxiques de la tumeur et de contrer la radiorésistance médiée par l'hypoxie. Cette étude a été réalisée chez 4 patients présentant des récurrences de chordomes à hauts risques et a démontré sa faisabilité¹⁰⁸. D'autres études sont nécessaires pour démontrer l'efficacité de cette approche.

D'autres essais cliniques sont en cours d'évaluation. Un essai clinique de phase I (NCT01407198) évalue la combinaison des inhibiteurs des récepteurs à tyrosine kinase PDGFR et Bcr-Abl avec de la radiothérapie fractionnée (28 fractions de 1,8 à 2 Gy) chez 29 patients présentant des chordomes à haut risque. Deux essais cliniques d'immunothérapie combinée à de la radiothérapie : un essai clinique de phase II (NCT03595228) évaluant la combinaison d'un traitement au vaccin Brachyury pendant 14 jours suivi d'une radiothérapie fractionnée chez 29 patients présentant des chordomes avancés, et un essai clinique de phase I NCT02989636 rassemblant 33 patients atteints de chordomes récidivants ou avancés évalue l'efficacité de la combinaison de l'inhibiteur de PD-1 nivolumab en combinaison à de la radiochirurgie stéréotaxique.

Ces études montrent que les combinaisons de thérapies systémiques et radiothérapie peuvent être efficaces dans le traitement du chordome. Une

approche ciblant l'aldéhyde déshydrogénase pourrait être intéressante dans le chordome puisqu'elle ciblerait à la fois les cellules souches et le métabolisme anti oxydant.

III. L'aldéhyde déshydrogénase, cible thérapeutique radiosensibilisante

Le chordome est caractérisé par une forte hypoxie à l'origine d'un métabolisme oxydant augmenté et par la présence de cellules au caractère souche. Une famille d'enzymes est impliquée à la fois dans le métabolisme anti oxydant et les cellules souches : les aldéhydes déshydrogénases. Il s'agit d'une famille de 19 enzymes NAD(P) dépendantes qui catalysent l'oxydation d'une variété d'aldéhydes endogènes et exogènes toxiques pour la cellule en produits moins toxiques les acides carboxyliques²⁹⁴. Ces enzymes peuvent être localisées dans le cytoplasme, le noyau, le réticulum endoplasmique, et la mitochondrie^{295,296}. Chaque ALDH peut avoir un ou plusieurs substrats avec des affinités de liaison différentes²⁹⁷.

1. Les ALDH, facteurs de mauvais pronostic dans les tumeurs solides

Dans les cancers, les isoformes d'ALDH les plus étudiés sont : ALDH1A²⁹⁸, ALDH3A1²⁹⁹ et ALDH18A1³⁰⁰. Quelques études suggèrent le rôle des ALDH5A1³⁰¹ et 7A1 dans les cancers³⁰². La proportion de cellules ayant une forte activité ALDH est plus élevée dans les sarcomes osseux qui ont métastasé (18%) que dans ceux qui n'ont pas métastasé (2%)^{303,304}. De plus, la surexpression de l'ALDH1 a déjà été corrélée avec un mauvais pronostic dans de nombreuses tumeurs solides tels que les cancers de la peau²⁹⁸, du poumon²⁹⁹ ou du sein³⁰⁵. Dans les cancers du sein, l'expression de l'ALDH1A3 est corrélée au grade de la tumeur, à son stade et est prédictive des métastases³⁰⁶.

2. Les ALDH, marqueurs de cellules souches cancéreuses

Dans l'ostéosarcome, les cellules à activité ALDH élevée montrent des capacités d'initiation tumorale et de migration plus élevées que les cellules à activité ALDH faible, à la fois *in vitro* et *in vivo*³⁰⁷. C'est également le cas dans de nombreuses tumeurs solides (cancer de la prostate³⁰⁸, de l'ovaire³⁰⁹, glioblastome³¹⁰). Ces cellules à activité ALDH élevée sont également caractérisées par l'expression d'un répertoire de gènes mésenchymateux Oct4, Nanog, Sox2³¹¹.

Plusieurs études ont déjà établi un lien entre les ALDH et des voies de signalisation cruciales pour les cellules souches. L'activité ALDH peut être régulée par les voie de signalisation NOTCH²⁷¹, Wnt³¹² et Nanog³¹³.

Les cellules à forte activité ALDH possèdent donc des propriétés souches et ont été définies comme cellules souches cancéreuses. Les ALDH ne sont pas que des marqueurs de cellules souches, mais ont aussi des fonctions cellulaires contribuant à la survie de ces cellules face aux stress.

3. Les ALDH, fonctions cellulaires

Les cellules cancéreuses ont une demande métabolique forte, un fort stress oxydant et une production de ROS importante. Ces activités induisent un stress sur les membranes cellulaires, conduisant à la peroxydation des lipides. La peroxydation lipidique induit la formation et l'accumulation de plus de 200 aldéhydes hautement toxiques pour la cellule (incluant le 4-hydroxynonéal, le malondialdéhyde (MDA), le 4-oxononéal, l'acroléine, le crotonaldéhyde et le méthylglyoxal)²⁹⁵. Ces aldéhydes pourraient inhiber la prolifération et la survie des cellules cancéreuses. La surexpression des ALDH permet de réduire les effets toxiques des aldéhydes sur les cellules cancéreuses³¹⁴ (Figure 22). Les ALDH ont donc le rôle primordial de détoxification de la cellule des aldéhydes donnant ainsi aux cellules cancéreuses des avantages face aux traitements anti-cancéreux.

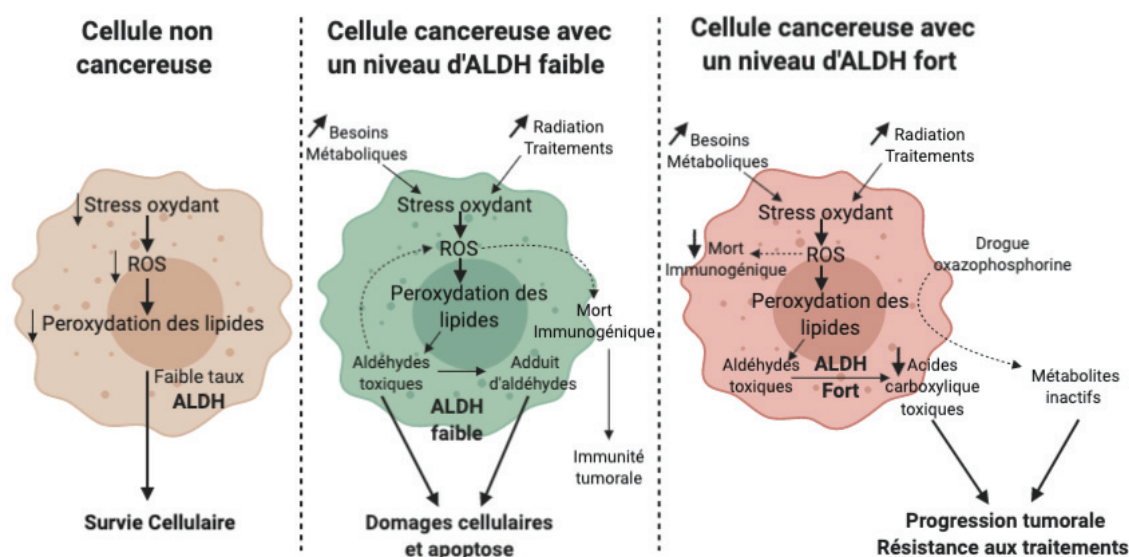


Figure 22- Rôle des ALDH dans le cancer- Dans une cellule cancéreuse, l'augmentation des besoins métaboliques et les traitements appliqués aux cellules induisent un fort stress oxydant. La peroxydation des lipides induit alors la formation d'aldéhydes toxiques qui pourraient nuire à la survie de la cellule si une activité ALDH élevée ne permettait pas de les prendre en charge et de les éliminer.

4. Rôles des ALDH dans la résistance aux traitements

Les cellules présentant une forte activité ALDH sont impliquées dans la résistance aux thérapies conventionnelles et aux thérapies ciblées.

(A) Chimiothérapie :

Certains agents de chimiothérapie sont peu efficaces sur les cellules souches cancéreuses. Cette résistance à la chimiothérapie est en partie dû à l'activité ALDH. Dans les sarcomes d'Ewing, une forte résistance à la doxorubicine et à l'étoposide est observée pour les cellules ALDH+ isolées de lignées cellulaires et de xenogreffes³¹⁵. Les cancers de l'œsophage résistants au 5-fluorouracile ont une activité ALDH élevée et un phénotype agressif in vitro dans des essais de formation de sphères³¹⁶. Plusieurs études se sont concentrées sur les mécanismes par lesquels les ALDH permettent de résister à la chimiothérapie. Les ALDH1A1 et 1A3 sont capables d'inactiver directement les agents de la famille des

oxaphosphorines tel que le cyclophosphamide³¹⁷. Un traitement à la radiothérapie ou à la chimiothérapie induit la production de ROS intracellulaires qui sont éliminés lorsque des taux élevés d'ALDH sont présents³¹⁸.

(B) Radiothérapie :

Les cellules à activité ALDH élevée sont aussi à l'origine d'une résistance à la radiothérapie. En effet, dans le cancer du sein, les cellules ALDH+ ont une meilleure survie après exposition aux radiations que les cellules ALDH- (45% vs 10%)^{313,319}. C'est aussi le cas dans les carcinomes cervicaux³²⁰, rectaux³²¹ et les cancers de la prostate³²¹. Les mécanismes de résistance aux radiations de ces cellules à activité ALDH élevée passeraient par des capacités de réparation de l'ADN augmentées.

(C) Thérapies ciblées :

Les ALDH peuvent aussi atténuer l'efficacité des thérapies ciblées telles que les inhibiteurs d'EGFR erlotinib et gefitinib. Dans le cancer du poumon, les cellules ALDH+ et ALDH- ont des taux de survie différents en réponse à un traitement au gefetinib, 60 et 30% respectivement, démontrant une plus forte résistance au gefetinib pour les cellules ALDH+. De plus, les lignées résistantes présentent un plus fort taux de cellules ALDH+ (37%) que les lignées sensibles (6,5%)³²². Les cellules de cancer du sein ALDH+ ont un taux plus élevé de PARP1, causant la résistance à l'inhibiteur de PARP1 olaparib³²³.

5. Les inhibiteurs d'ALDH

Depuis, plusieurs inhibiteurs des ALDH ont été développés. Ces inhibiteurs peuvent être classés en 2 catégories : les inhibiteurs d'isoformes multiples de l'ALDH et les inhibiteurs spécifiques d'isoformes³²⁴. Ces inhibiteurs ont été testés seuls ou en combinaison avec des agents de chimiothérapie ou des radiations.

Le DEAB est un inhibiteur irréversible de l'ALDH1A2 et de l'ALDH2. Il s'agit aussi d'un inhibiteur compétitif réversible de l'ALDH1A1, 1A3, 1B1, 5A1. Cet inhibiteur sensibilise les cellules ALDH+ d'une lignée cellulaire de cancers du sein au paclitaxel, à la doxorubicine et aux radiations. Par exemple, les cellules traitées à la doxorubicine sont capables de former 50 colonies alors que celles traitées à la doxorubicine et au DEAB en forment moins de 10³²⁵. De la même façon, le disulfiram, inhibiteurs des ALDH, potentialise l'effet des radiations dans des lignées cellulaires de glioblastomes, de tumeurs rhabdoïdes, de neuroblastomes, et de cancers pancréatiques avec des effets antiprolifératifs et d'induction de la mort cellulaire³¹⁰. L'utilisation d'un inhibiteur des ALDH1 sensibilisent les cellules de cancers ovariens à la chimiothérapie à la fois *in vitro* et *in vivo*. En effet, des régressions tumorales sont observées à la suite d'une combinaison de carboplatine/panALDH1 et cisplatine/panALDH1 dans des modèles de xénogreffes de cellules de cancers ovariens³⁰⁹.

Ces études montrent l'efficacité d'une approche radiosensibilisante ciblant les ALDH. Depuis d'autres inhibiteurs d'ALDH ont été développés, à la fois plus spécifiques et moins toxiques. Le DIMATE, 4-Diméthylamino-4-méthylpent-2-ynthioic acid-S-méthylester, est un inhibiteur compétitif de l'ALDH1A1 et de l'ALDH3A1. Le DIMATE a démontré des effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques dans le cancer de la prostate³²⁶, le mélanome³⁰⁶, la leucémie³²⁷ et le cancer du poumon³²⁸ à la fois *in vitro* et *in vivo*. Le DIMATE induit l'apoptose des lignées cellulaires de leucémies myéloïdes aigues alors qu'il n'affecte pas la viabilité des cellules normales. De plus, il induit une diminution des cellules tumorales circulantes *in vivo* dans des modèles de leucémie myéloïde. Par ailleurs, dans des modèles de cancer du poumon, le DIMATE a un effet cytotoxique sur 9 lignées cellulaires de cancer du poumon et 13 cultures primaires de cellules de cancer du poumon issues de PDX.

Ainsi, les inhibiteurs d'ALDH ont montré une action synergique avec différentes chimiothérapies et radiothérapies, pour inhiber la progression

de la maladie et prévenir le développement de résistance. L'évaluation de l'efficacité de ce genre de combinaison n'a jamais été évaluée dans le chordome et représenterait une stratégie intéressante d'une part, pour leur action sur les cellules à activité ALDH élevée, et d'autre part pour leur rôle dans la balance oxydative.

Cette introduction bibliographique a permis de soulever les difficultés de l'étude des chordomes. D'une part, le faible nombre d'études à large échelle des altérations impliquées dans l'oncogénèse et la progression du chordome entraînent un manque de connaissances générales sur cette pathologie. D'autre part, le manque de modèles d'étude représentatifs des caractéristiques du chordome telles que sa croissance lente, son statut hypoxique et sa production de matrice extracellulaire abondante constituent un frein au développement de thérapies efficaces. Nous avons montré que l'amélioration des connaissances des mécanismes de radiorésistance a permis le développement de stratégies visant à réinstaurer la radiosensibilité des tumeurs. L'inhibition de l'activité aldéhyde déshydrogénase représente une stratégie radiosensibilisante intéressante dans le chordome, de par son implication dans le phénotype souche des cellules de chordome et de par son rôle dans le métabolisme antioxydant. C'est pourquoi ce projet, dont l'objectif global est d'améliorer les connaissances sur le chordome s'est déroulé en trois axes :

Axe 1 : déterminer le profil transcriptomique du chordome :

Une analyse transcriptomique d'une cohorte de 12 patients atteints de chordome a été réalisée et comparé à une banque de données transcriptomiques de sarcomes. Cette analyse a permis de resituer le chordome dans un paysage global des altérations transcriptomiques des fonctions biologiques principalement touchées dans les sarcomes.

Axe 2 : Établir et caractériser des modèles cellulaires 3D de chordome

En parallèle, nous avons établi et caractérisé des modèles cellulaires 3D de chordome. Le premier objectif de ce type de culture est de rétablir les propriétés particulières du chordome : une croissance lente, une forte hypoxie, la production de matrice extracellulaire. Un accent particulier a été

mis sur le répertoire transcriptomique des modèles établis en comparaison à celui des patients établis au préalable par séquençage ARN. Récapituler la progression tumorale représentant un enjeu majeur dans la modélisation du chordome. C'est pourquoi nous avons décidé d'établir 3 modèles représentant les 3 stades de la maladie : tumeur primaire, rechute et métastase. Enfin, en reconstituant un environnement 3D confortable pour la tumeur, notre troisième objectif était de reconstituer la radorésistance du chordome dans nos modèles. Pour cela, nous avons utilisé des thérapies aux rayons X, thérapie conventionnelle la plus souvent utilisée.

Axe 3 : Évaluer une approche radiosensibilisante inhibant les ALDH

Le chordome étant une tumeur radorésistante, une stratégie radiosensibilisante permettant d'améliorer l'efficacité des traitements des patients pourrait être intéressante. Dans ce contexte, nous avons testé la validité de l'aldéhyde déshydrogénase en tant que cible radiosensibilisante en évaluant à la fois son expression et son activité en réponse à une exposition à la radiothérapie. Une fois la cible validée, nous avons évalué l'efficacité d'un inhibiteur pharmacologique des aldéhydes déshydrogénases 1 et 3 en monothérapie ou en combinaison avec de la radiothérapie. Pour cela, nous avons évalué la prolifération, les capacités d'auto-renouveaulement et la mort cellulaire induite par les différents traitements.

Les résultats de ces différentes expériences seront exposés dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

Partie Expérimentale

Hypothèse et objectifs du projet de thèse

Le chordome est une rare tumeur du squelette axial qui, malgré une indolence certaine et un traitement agressif, rechute localement dans 50% des cas environ. Du fait de sa rareté, peu d'études cliniques spécifiques au chordome sont initiés, et les chordomes sont, au mieux, intégrés dans les « basket trial » sans qu'il y ait pour autant connaissance de l'état d'activation ou d'expression des cibles. Néanmoins, il devient urgent de développer de nouvelles approches thérapeutiques efficaces pour ces tumeurs résistantes aux traitements conventionnels. Pour mieux traiter, il est primordial de mieux comprendre leur biologie. Une stratégie intéressante pourrait être d'améliorer la radiosensibilité des tumeurs. Cependant, comme développé dans l'introduction bibliographique, peu d'études transcriptomiques large échelle ont été réalisées dans le chordome et sont souvent incomplètes car manquent de données cliniques associées au patient.

Par ailleurs, dans l'introduction bibliographique, nous avons montré le manque de modèles alternatifs permettant de représenter au mieux les caractéristiques des chordomes en se débarrassant des contraintes techniques et de temps des modèles animaux.

Mon projet de doctorat s'est donc établi autour de trois axes :

Axe 1 : déterminer le profil transcriptomique des chordomes par rapport aux autres sarcomes.

Axe 2 : établir et caractériser des modèles de culture cellulaire en trois dimensions de chordome

Axe 3 : confirmer leur validité pour des tests d'approches thérapeutiques, dans notre cas l'évaluation d'une approche radiosensibilisante.

Dans la partie expérimentale, les méthodes utilisées ainsi que les résultats de ces axes sont exposés. Les deux derniers axes font l'objet d'une publication dans le journal « Cells » (acceptée le 08/02/2021).

PARTIE 1 : ÉTABLISSEMENT DU PROFIL TRANSCRIPTOMIQUE DES CHORDOMES ET COMPARAISON AUX SARCOMES

Peu d'études se sont intéressées au profil transcriptomique des chordomes. Pour les études réalisées, les données ne sont pas toutes accessibles et les informations cliniques des patients ne sont pas complètes. Nous avons donc effectué un séquençage de l'ARN sur une cohorte rétrospective de 12 patients provenant de deux centres du réseau Unicancer: le centre Léon Bérard (Lyon) et le centre Jean Perrin (Bordeaux). Nous avons ensuite analysé par la technique GSEA les scores d'enrichissement pour des ensembles de gènes impliqués dans les grandes fonctions biologiques dérégulées dans les cancers. Puis nous avons comparé ces résultats à ceux de 1450 échantillons de sarcomes diagnostiqués au centre Léon Bérard. Nous avons comparé d'abord le répertoire transcriptomique complet des chordomes et sarcomes, puis spécifiquement les ensembles de gènes impliqués dans les grandes fonctions biologiques dérégulées dans les cancers, telles que l'angiogénèse, l'apoptose, l'hypoxie.

Le séquençage ARN et l'analyse bioinformatique des données issues de ce séquençage ont été réalisés en collaboration avec l'équipe « génétique, épigénétique et biologie des sarcomes » du Dr Franck Tirode (CRCL/CLB).

I. Matériels et méthodes

1. Présentation de la cohorte :

Une cohorte rétrospective de 12 cas de chordome a été constituée en collaboration avec le centre Léon Bérard (Lyon) et le centre Jean Perrin (Bordeaux). Cette cohorte est constituée de blocs FFPE de 11 tumeurs primaires sacrales, et d'une tumeur métastatique crânienne (Tableau 11). Ces échantillons ont été prélevés au moment de la chirurgie pour les patients opérés, et de la biopsie pour les patients non opérés. Aucun patient n'a reçu de traitements au préalable. L'âge des patients varie de 36 ans à 84 ans (moyenne au diagnostic : 63 ans). Trois patients ont présenté une

rechute et deux patients sont décédés des suites de la maladie, les autres sont vivants et n'ont pas montré de rechute.

Tableau 11 -Données cliniques de la cohorte de chordomes

Cas	Age	Sexe	Date du Diagnostic	Localisation	Taille de la tumeur (cm)	Types de prélèvement	Récidive locale (date) et Statut vital
1- CLB_RNA_2031	56	M	27/6/16	Sacrum	10	chirurgie	
2- CLB_RNA_2032	36	M	28/1/16	Sacrum	11,7	biopsie	AWD
3- CLB_RNA_2033	66	M	25/1/16	Sacrum		biopsie	
4- CLB_RNA_2035	72	F	14/11/11	Sacrum	9	chirurgie	
5- CLB_RNA_2036	58	M	25/5/11	Sacrum	6	chirurgie	Oui 17/05/2019
6- CLB_RNA_2037	40	M	29/2/12	Crâne	8,5	chirurgie	
7- CLB_RNA_2738	84	F	27/3/19	Sacrum	6	chirurgie	
8- CLB_RNA_2739	77	F	24/10/18	Sacrum	5,2	chirurgie	
9- CLB_RNA_2740	70	M	5/10/11	Sacrum	7	chirurgie	Oui (02/03/2018)
10- CLB_RNA_2839	59	F	2/5/16	Sacrum	8	chirurgie	Oui (27/03/2018)
11- CLB_RNA_2847	67	M	23/4/15	Sacrum		biopsie	AWD
12- CLB_RNA_2848	70	M	15/5/19	Sacrum		biopsie	AWD / 18/06/2015

2. Séquençage de l'ARN

Afin de réaliser le profil transcriptomique par séquençage de l'ARN, l'ARN total a été extrait à partir des lames de blocs FFPE macro-disséquées par l'utilisation du kit FormaPure RNA (Beckman Coulter #C19158, Brea, CA, USA). L'ADN présents dans les échantillons a été retiré par le traitement à la DNase du kit RNase-free DNase set (Qiagen #AM2222, Courtaboeuf, France). Après quantification des ARN à l'aide du Nanodrop2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), leur qualité est confirmée par la valeur DV200, proportion de fragments d'ARN supérieurs à 200 nucléotides, apportée par la TapeStation with Hs RNA ScreenTape (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Les échantillons contenant une quantité d'ARN (>0,5µg) et une qualité (DV200>30%) suffisantes ont été ensuite analysés par séquençage. Les bibliothèques ont été préparées à partir de 100ng d'ARN total à l'aide de TrueSeq RNA Exome (Illumina #20020183, San Diego, USA). Les banques

de fragments d'ARN ont été préparées à la concentration de 4nM avec 1% de PhIX, qui sont de courtes séquences connues permettant de faciliter l'alignement. 2x75 cycles de séquençage pairé ont été réalisés à l'aide du kit NextSeq 500/550 High Output V2 sur l'appareil NextSeq500 (Illumina). Le séquençage pairé implique que pour les longues séquences ARN, les extrémités sont séquencées, ce qui permet de connaître la distance séparant les deux lectures et facilite l'alignement sur le génome humain. Les fragments séquencés ont ensuite été alignés sur le génome humain de référence GRCh38 via l'aligneur STAR. Le nombre de copies de lecture a été évalué grâce à l'outil PICARD. Aucun échantillon n'a été retiré de l'analyse. Les valeurs d'expression ont été extraites à l'aide du logiciel Kallisto version 0.42.5 tool17, avec GENECODE basés sur le génome de référence GRCh38. Les valeurs Kallistos du nombre de Transcrits Par Millions (TPM) ont été transformées en $\log_2(\text{TPM}+2)$, et tous les échantillons ont été normalisés ensemble à l'aide de la méthode des quantiles contenue dans le package R limma, sur R (version 3,1,1).

3. Analyses associées

- **Établissement du profil des chordomes par rapport aux hallmarks des cancers :**

Les données de séquençage nous ont permis de réaliser des scores à l'aide de GSEA, une méthode permettant de calculer un score d'enrichissement pour un ensemble de gènes représentatifs d'une fonction biologique. Les sets de gènes sélectionnés sont regroupés sous le nom de « Cancer Hallmarks » dans la base de données MSigDB. Ces scores nous permettent de représenter l'expression des gènes des tumeurs en fonction des processus biologiques souvent altérés dans les cancers.

- **Comparaison du transcriptome des chordomes au transcriptome des sarcomes :**

Nous avons d'abord effectué une comparaison du transcriptome entier des chordomes et des sarcomes en réalisant une analyse de réduction de dimension à l'aide de l'algorithme UMAP³²⁹. Cette méthode permet de visualiser graphiquement la variance entre échantillons, ce qui permet de se représenter leurs différences ou leurs similitudes en fonction de la distance qui sépare deux échantillons. Plus deux échantillons sont proches, plus ils sont similaires en termes d'expression génique globale. A l'inverse, plus ils sont éloignés et plus l'expression globale de leurs gènes sera différente.

- **Comparaison des profils d'enrichissement Hallmark entre sarcomes :**

Les fonctions biologiques les plus souvent dérégulées dans les cancers sont appelées hallmark et comprennent : l'angiogénèse, le cycle cellulaire, l'hypoxie, la glycolyse, la phosphorylation oxydative et l'apoptose. Les scores d'enrichissement calculés pour chaque hallmark ont ensuite été comparés aux déciles de la distribution des valeurs NES des ssGSEA des 1450 échantillons de sarcomes. Ainsi, ils permettent de comparer l'altération, au niveau transcriptomique ici, de ces voies biologiques du chordome avec le groupe de classification tumoral supérieur, qui est représenté par les sarcomes.

- **Ébauche du profil immunitaire infiltrant du chordome :**

Une façon d'aborder le profil immunitaire des chordomes par analyse transcriptome est l'utilisation de l'algorithme de déconvolution CIBERSORT. Il s'agit d'un algorithme basé sur l'expression de 547 gènes qui permet de différencier 22 types cellulaires immunitaires infiltrant les tumeurs dont les cellules T, les cellules B, les cellules plasmocytaires, les cellules NK et les cellules myéloïdes. Cet algorithme permet donc de définir les cellules immunitaires infiltrant un tissu tumoral.

II. Résultats

1. Analyse des voies de signalisation spécifiques du chordome

Afin de mieux connaître le répertoire transcriptomique des chordomes, le score d'enrichissement des gènes associés à chaque grande fonction altérée dans les cancers (hallmark) a été calculé et est représenté sous forme de carte d'expression (Figure 23).

Les scores les plus élevés sont retrouvés pour les fonctions biologiques de la phosphorylation oxydative (HOXPPOS), de l'hypoxie, et de la transition épithélio-mésenchymateuse (Figure 23). Les voies de signalisation les moins représentées sont celles de l'inflammation, de l'angiogénèse, et de la phase G2/M du cycle cellulaire (Figure 23). Ces résultats reflètent les caractéristiques du chordome : une tumeur ayant une croissance lente, une vascularisation faible, et une hypoxie forte.

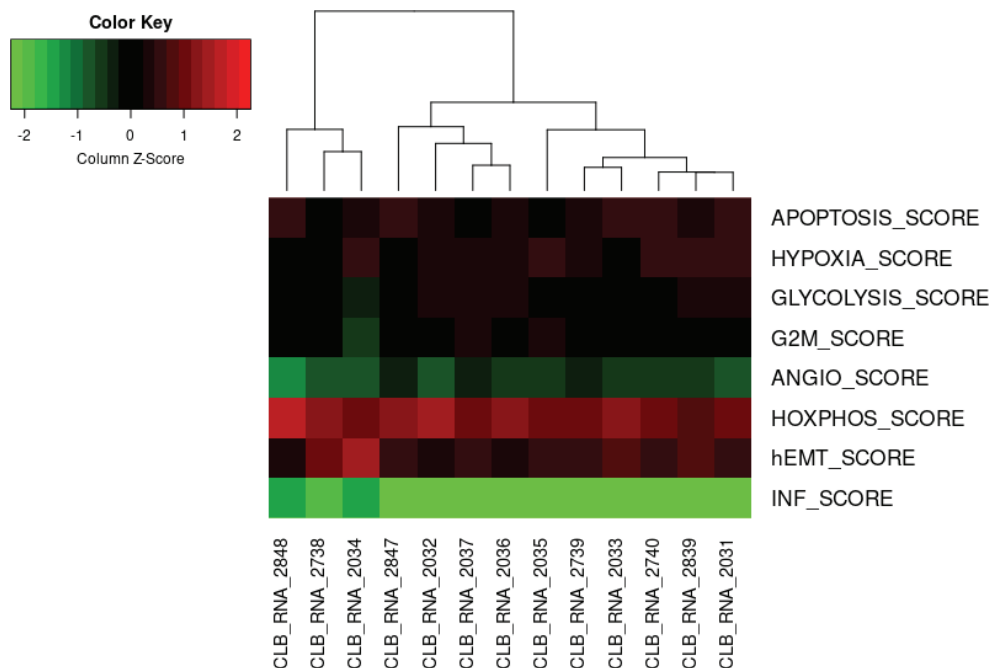


Figure 23- Carte d'expression des scores d'enrichissement pour chaque fonction biologique par échantillon- Les sets de gènes de la phosphorylation oxydative (HOXPPOS), de l'hypoxie (HYPOXIA), de l'apoptose (APOPTOSIS) de la transition épithélio mésenchymateuse (hEMT), de la glycolyse (GLYCOLYSIS), du cycle cellulaire (G2M), de l'angiogénèse (ANGIO) et de l'inflammation (INF) sont

présentés en ordonnées. Les patients sont présentés en abscisse. L'échelle des scores est représentée à gauche de la carte.

2. Comparaison du répertoire transcriptomique des chordomes et des sarcomes

Pour situer le profil transcriptomique des chordomes par rapport aux sarcomes, une visualisation UMAP a été réalisée. Elle compare les expressions géniques des chordomes avec 1450 cas de sarcomes séquencés au CLB (essentiellement des sarcomes des tissus mous) (Figure 24). La visualisation UMAP a permis d'identifier au moins 144 types moléculaires de sarcomes différents.

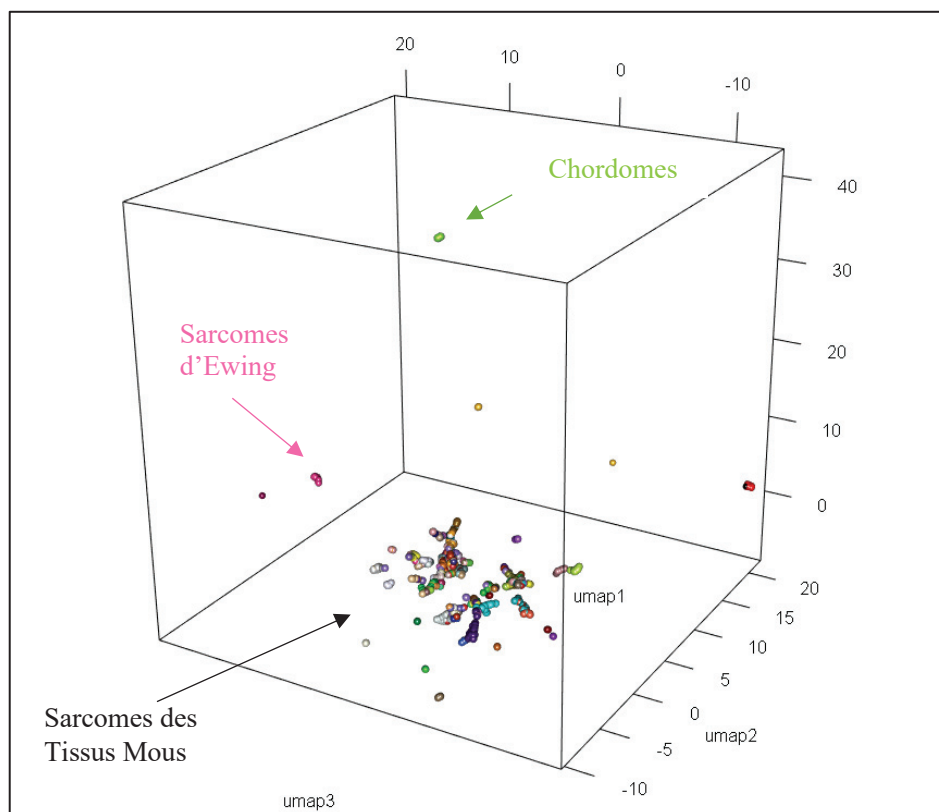


Figure 24- Graphique représentant la répartition de 1450 échantillons de sarcomes et de 12 échantillons de chordomes par la méthode de réduction de dimension UMAP. 144 sous-types moléculaires sont observés et les chordomes forment un cluster homogène éloigné des autres sarcomes.

Malgré la présence de différents sous-types histologiques et moléculaires, les sarcomes des tissus mous ont des profils transcriptomiques proches et

forment un large groupe sur cette figure (Figure 24). Au contraire, les sarcomes osseux ont un profil transcriptomique plus éloigné, à la fois des sarcomes des tissus mous, mais également entre chaque sous-type osseux (sarcome d'Ewing). C'est aussi le cas pour le cluster de chordomes qui est le plus éloigné de tous les autres sarcomes.

La méthode de représentation UMAPa permis d'observer que les chordomes sont regroupés dans un cluster homogène et distant des sarcomes des tissus mous. De plus, malgré leur localisation osseuse, les chordomes présentent également un profil transcriptomique éloigné des autres sarcomes osseux.

3. Voies de signalisation différemment exprimées entre chordomes et sarcomes

Afin d'approfondir l'analyse de nos échantillons de chordome, les scores pour chaque fonction biologique ont été comparés aux scores moyen des sarcomes pour chacun des patients (Figure 25).

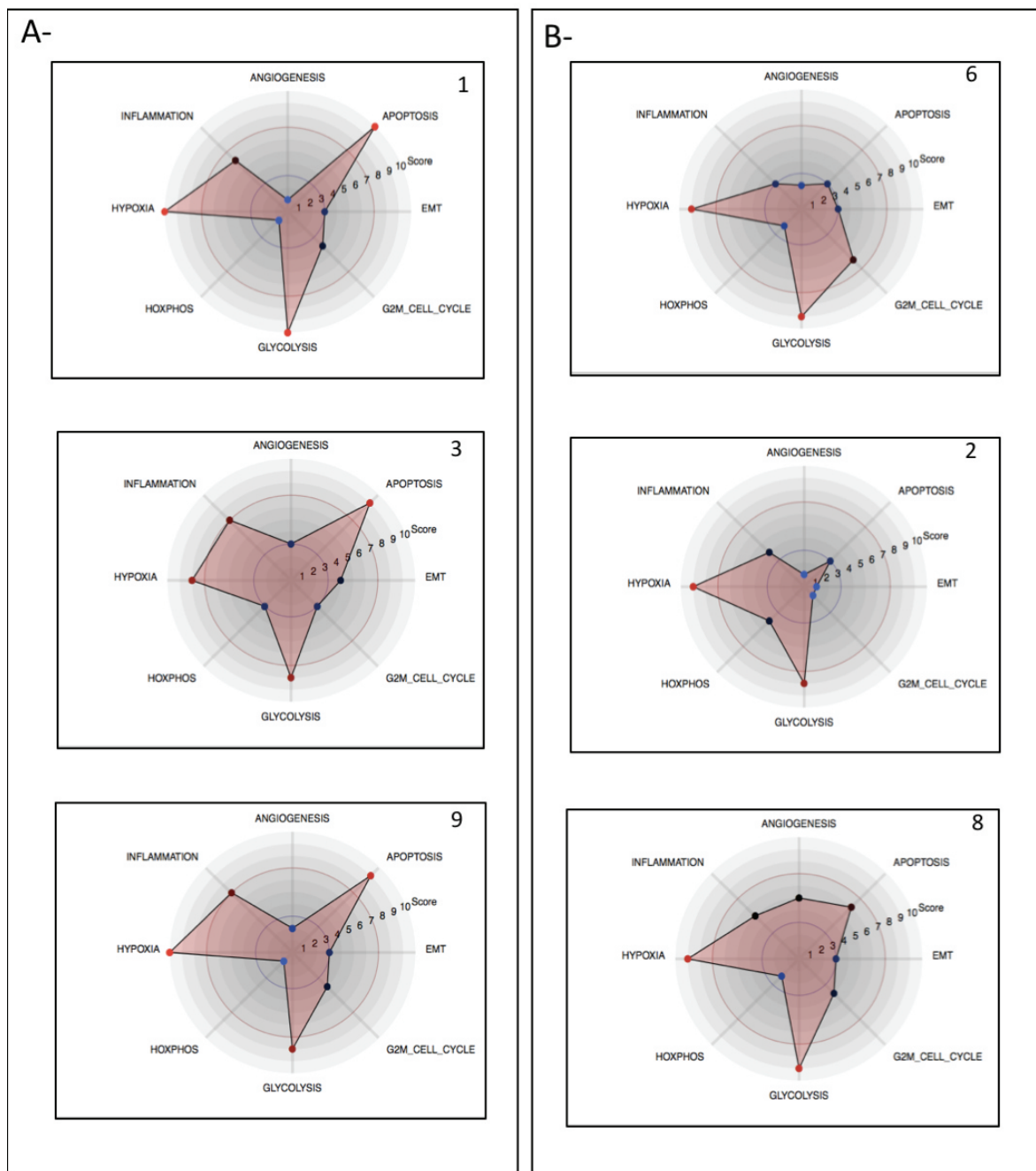


Figure 25- Graphiques représentatifs du score NES calculé à partir de la méthode GSEA de chaque échantillon de chordome comparé à l'ensemble des sarcomes. Les panels A et B présentent des exemples des deux profils les plus couramment retrouvés au sein des échantillons.

L'analyse différentielle nous permet de retirer plusieurs informations. Dans l'ensemble, les chordomes présentent des scores très extrêmes, confirmant leur éloignement des autres sarcomes. Deux profils majoritaires de chordomes ont pu être observés (Figure 25A et B). Tous ont de très hauts scores pour les voies de signalisation de l'hypoxie (8 à 10) et de la glycolyse

(8 à 10), ainsi que de faibles scores pour les voies de la phosphorylation oxydative (0 à 4), du cycle cellulaire (0 à 6), et de l'angiogénèse (0 à 5). Ces résultats démontrent que les chordomes ont une expression génique plus élevée des voies de l'hypoxie et la glycolyse, et une expression plus faible des voies de la phosphorylation oxydative et du cycle cellulaire par rapport aux autres sarcomes.

En revanche, les scores obtenus pour la voie de l'apoptose sont les plus variables et diffèrent entre les deux groupes présentés. Dans certains échantillons, ce score est très élevé (9 à 10, Figure 25A) alors qu'il peut être faible dans d'autres échantillons (3 à 6, Figure 25B). Cette différence n'est associée significativement à aucun signe clinique. Enfin, malgré une infiltration immunitaire faible dans ces tumeurs, les chordomes présentent des scores inflammatoires moyens (4 à 6). L'inflammation et l'infiltration immunitaire étant très peu étudiées dans le chordome, nous nous sommes donc intéressés par la suite au profil immunitaire de ces échantillons.

4. Profil immunitaire transcriptomique des chordomes :

Nous avons commencé à établir les profils immunitaires des chordomes par la méthode du CIBERSORT qui permet d'observer les types de cellules immunitaires infiltrant une tumeur. Les résultats montrent que très peu de cellules immunitaires sont présentes dans les échantillons tumoraux de chordome. Deux patients présentent une infiltration élevée. Cette infiltration est caractérisée par de forts scores pour les cellules dendritiques, les cellules NK, les macrophages, et les cellules T pour le premier. Elle est caractérisée par de forts scores pour les cellules T et NK uniquement pour le second. Dans les autres échantillons, bien que faiblement exprimée, les populations les plus représentées sont les granulocytes, les mastocytes et les macrophages (Figure 26).

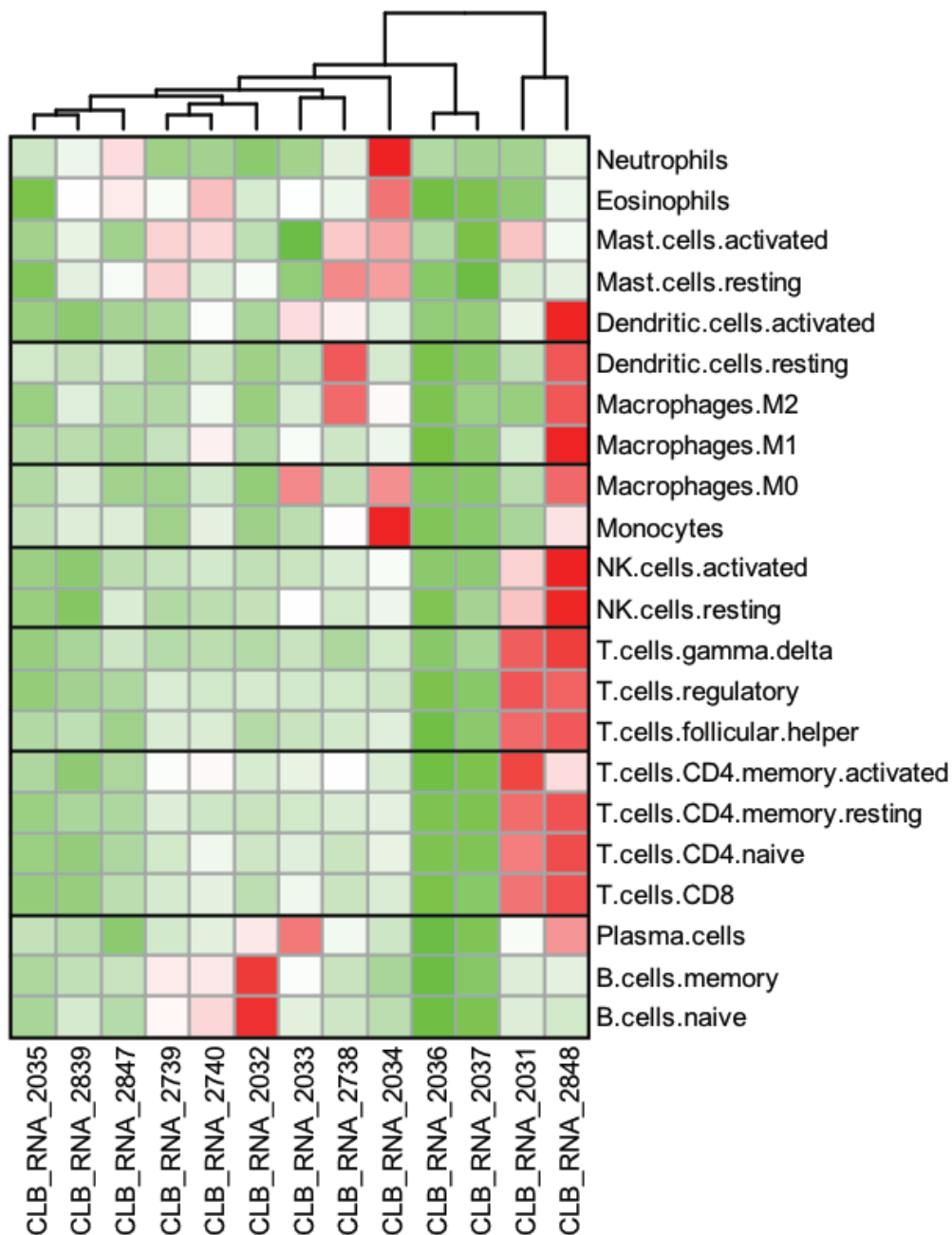


Figure 26- Carte représentant les niveaux d'expression des gènes rapportés aux cellules immunitaires.

En conclusion, le chordome se différencie des sarcomes par une expression forte des gènes impliqués dans l'hypoxie et la glycolyse ; et par une expression faible des gènes impliqués dans l'angiogénèse, le cycle cellulaire et la phosphorylation oxydative. De plus, le chordome présente une faible infiltration immunitaire dont la composition varie d'un patient à l'autre.

Cette première partie a permis d'améliorer nos connaissances sur le chordome en identifiant les caractéristiques particulières le distinguant des autres sarcomes.

PARTIE 2 ÉTABLISSEMENT ET CARACTÉRISATION DE MODELES CELLULAIRES 3D

Les bénéfices des techniques 3D appliquées aux autres tumeurs solides nous ont conduit à l'établissement et la caractérisation de ce genre de modèles chordome. Pour cela, nous avons sélectionné trois lignées cellulaires U-CH12, U-CH1 et CH22 établies à partir de tumeurs de patients. Ces trois lignées représentent les trois stades d'évolution de la pathologie : tumeur primaire, rechute locale et métastase. Ces sphéroïdes ont été caractérisés d'un point de vue histologique, morphologique, et transcriptomique. Nous avons ensuite validé leur utilisation pour évaluer de nouvelles approches thérapeutiques. Pour cela, nous avons testé les capacités d'un inhibiteur des ALDH1 et 3 à restaurer la radiosensibilité des sphéroïdes. La caractérisation des modèles ainsi que l'évaluation thérapeutique de l'inhibiteur des ALDH a fait l'objet d'une publication intitulée « Aldehyde dehydrogenase, a therapeutic target in chordoma : analysis in 3D models », en cours de révision pour publication dans le journal « Cells ».

Les paragraphes suivants résument les points essentiels de cette étude.

I. Établissement des modèles cellulaires

Les sphéroïdes ont été générés à partir de trois lignées cellulaires de chordome U-CH12, U-CH1 et CH22 mise en culture dans des plaques à faible adhérence sans addition de MEC. Une fois établis, les sphéroïdes ont été caractérisés au niveau histologique (expression des marqueurs de chordome), morphologique et du répertoire transcriptomique.

1. Caractérisation histologique, morphologique et transcriptomique

Au niveau histologique, les sphéroïdes expriment les marqueurs diagnostics du chordome : Brachyury, CD24, cytokératines et EMA (Figure 27, A). Cultivées en 3D, les cellules de chordome ont un cytoplasme rempli de vacuoles, correspondant au phénotype physaliphore retrouvé spécifiquement dans les chordomes (Figure 27, B). La présence de jonctions cellulaire dans les sphéroïdes CH22 et de matrice extracellulaire dans les sphéroïdes U-CH1 et U-CH12 a été observée(Figure 27, B).

(a)	Brachyury	CD24	Cytokeratins	EMA
U-CH12	+	++	+	+++
U-CH1	++	++	++	+++
CH22	+++	+++	++	+++

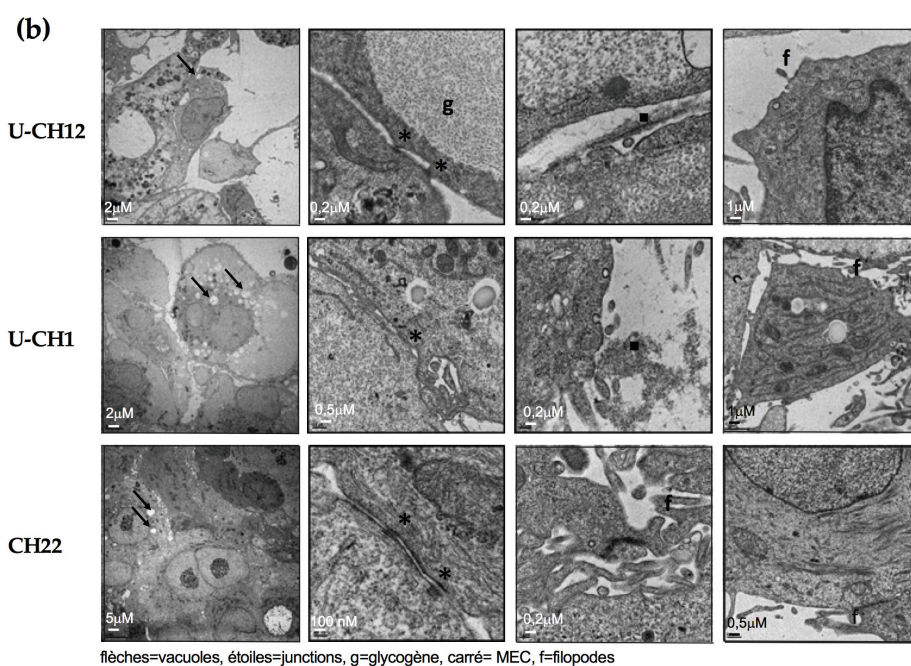


Figure 27-Caractérisation histologique et morphologique des sphéroïdes de chordome. (a) Quantification des IHC des marqueurs de diagnostic du chordome Brachyury, CD24, EMA et CK. (b) Images représentatives de la morphologie des sphéroïdes par microscopie électronique. Les flèches représentent les vacuoles, les étoiles : jonctions, les carrés : la matrice extracellulaire, les f : filopodes, les g : granules de glycogènes.

Enfin, le séquençage ARN des modèles a été réalisé puis comparé à celui de la cohorte de chordomes et de sarcomes. Une analyse tSNE montre que ces modèles clusterisent avec les 12 cas de chordome séquencés (Figure 28).

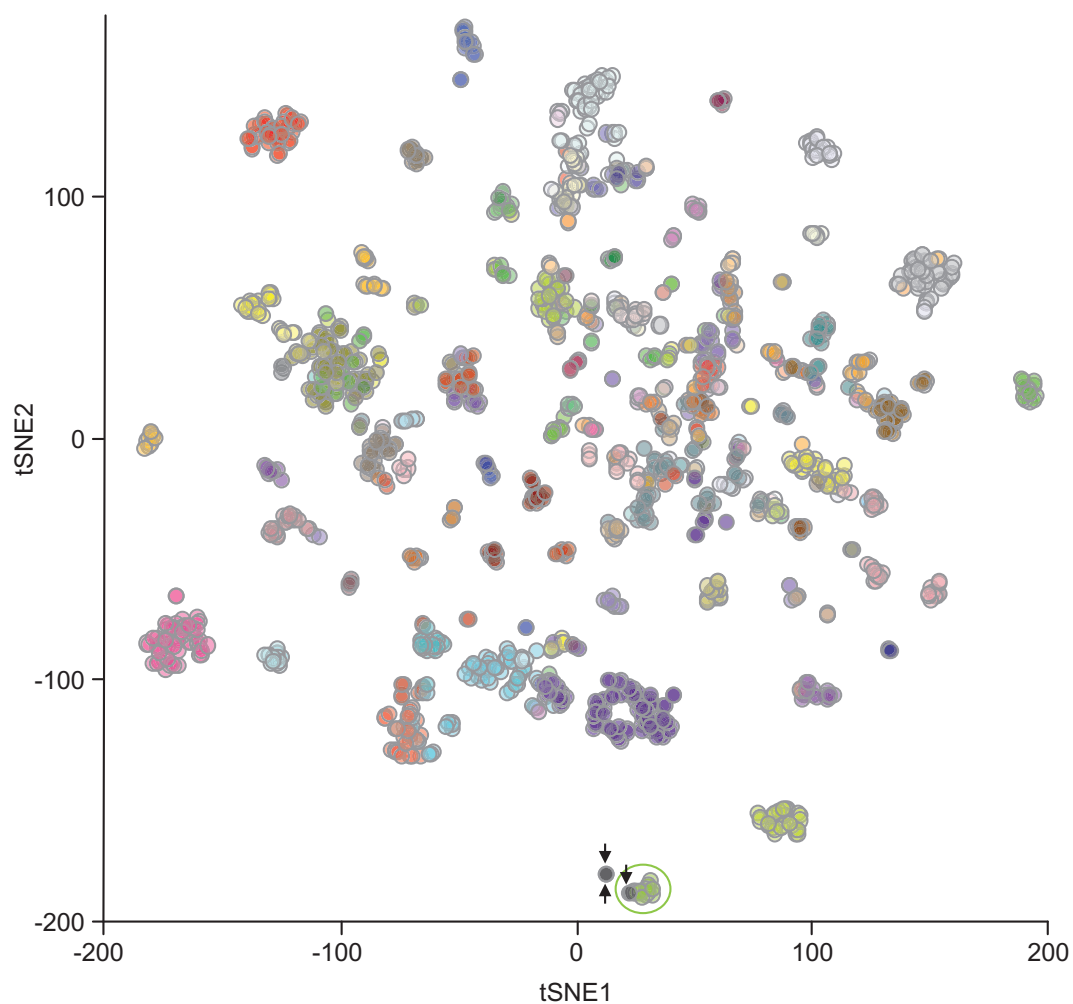


Figure 28- Visualisation de l'analyse tSNE montrant la clusterisation des 12 échantillons de chordomes et des 3 sphéroïdes indiqués par des flèches sur la figure.

Ces analyses histologiques, morphologiques et transcriptomiques indiquent que les sphéroïdes sont bien représentatifs de la présentation clinique du chordome.

2. Radiorésistance des sphéroïdes

Nous nous sommes ensuite intéressés à trois caractéristiques du chordome potentiellement impliquées dans la radiorésistance : leur faible prolifération, le statut hypoxique et la production de matrice extracellulaire. Les sphéroïdes présentent des zones hypoxiques et produisent spontanément une matrice extracellulaire qui est abondante pour U-CH1 et U-CH12 et faible pour CH22 (Figure 29A). Ils présentent de plus trois niveaux de prolifération différents avec U-CH12, issu de la tumeur primaire,

sphéroïde à la croissance la plus lente, et CH22, issu de la métastase, à la croissance la plus rapide (Figure 29B). Ainsi, les sphéroïdes issus de la tumeur primaire sont peu cellulaires, possèdent une matrice abondante et une croissance faible alors que les sphéroïdes issus de métastases sont très cellulaires, possèdent une matrice faible et se divisent rapidement.

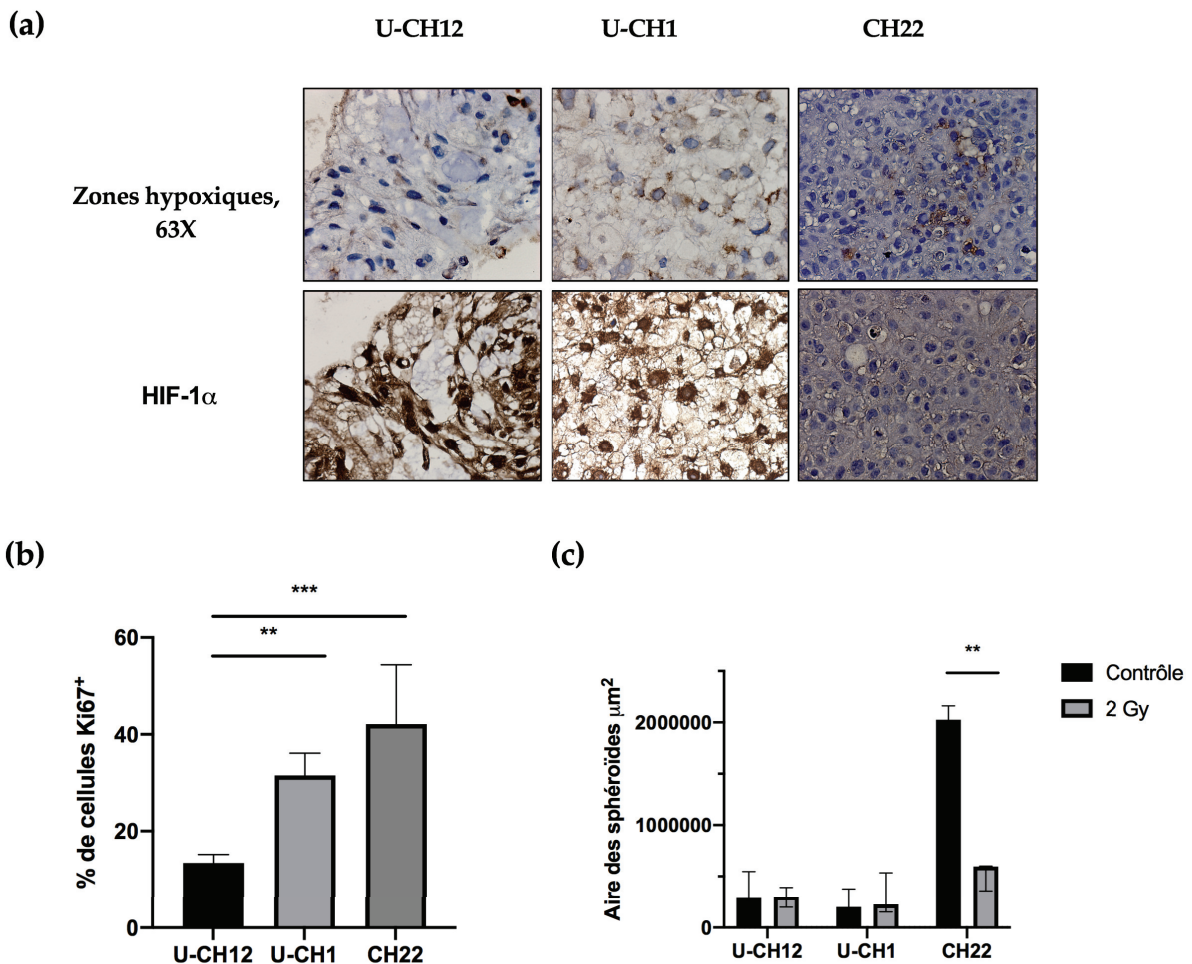


Figure 29- Caractérisation du statut hypoxique, de la prolifération et de la réponse aux radiations des sphéroïdes de chordome. (a) Cartographie des zones hypoxiques des sphéroïdes par marquage au pimonidazole et marquage de HIF-1 α . (b) Évaluation du nombre de cellules Ki67+ pour chaque sphéroïde. (c) Graphique représentatif de la taille des sphéroïdes formés en condition contrôle ou après 2Gy de rayons X. Chaque expérience a été répétée trois fois en triplicat. La comparaison entre les groupes contrôle et traités a été réalisé par un test ANOVA à deux composantes. Les p-values significatives sont indiquées comme suit : p < 0.05 *, p < 0.01 **, p < 0.001 ***, p < 0.0001 ****.

Afin de déterminer la sensibilité des sphéroïdes à la radiothérapie, nous avons mesuré leur capacité à former des sphères après irradiation aux

rayons X (2 Gy). Les résultats démontrent que les sphéroïdes U-CH1 (NT : $198\mu\text{m}^2$; 2 Gy : $286\mu\text{m}^2$) et U-CH12 (NT : $224\mu\text{m}^2$; 2 Gy : $300\mu\text{m}^2$) gardent la capacité à reformer des sphères après traitement à l'inverse de sphéroïdes CH22 dont la capacité à reformer des sphères est fortement diminuée après traitement (NT : $597\mu\text{m}^2$; 2 Gy : $2,10^6\mu\text{m}^2$; $p < 0,001$) (Figure 29C).

Ainsi, les sphéroïdes présentent 3 niveaux de radiorésistance différents, U-CH12 le modèle le plus radiorésistant et CH22 le modèle le plus radiosensible. Ces modèles sont donc adaptés à l'étude de la radiorésistance. Le tableau 12 récapitule les caractéristiques principales des sphéroïdes.

Tableau 12- Récapitulatif des caractéristiques des sphéroïdes de chordome

	U-CH12, Sacral, Primaire	U-CH1, Sacral, Rechute	CH22, Métastase
Prolifération	●	●	● ● ●
Expression de Brachyury	●	● ●	● ● ●
Production de MEC	● ● ●	● ● ●	●
Hypoxie	● ● ●	● ●	● ●
Radiorésistance	● ● ●	● ●	●

II. L'aldéhyde déshydrogénase, une cible thérapeutique potentielle pour le traitement du chordome

1. Expression transcriptomique, protéique et évaluation de l'activité aldéhyde déshydrogénase

Les aldéhydes déshydrogénases sont une famille d'enzymes impliquées dans la détoxification des aldéhydes, dont l'accumulation est toxique pour

la cellule. Une analyse transcriptomique a montré la forte expression des ALDH3A2, 3B1 et 1A2 à la fois dans les sphéroïdes et la cohorte de 12 cas. Nous avons pu de plus mettre en évidence l'expression de l'ALDH3A2 au niveau protéique dans les 3 modèles (Figure 30A). Nous avons également montré un enrichissement en cellules à haute activité aldéhyde déshydrogénase après irradiations dans tous les sphéroïdes (Figure 30B). Tous ces éléments montrent que l'ALDH est potentiellement impliquée dans la radiorésistance des chordomes.

2. Effets de l'inhibition de l'activité aldéhyde déshydrogénase

Ces observations nous ont mené à évaluer l'efficacité d'un inhibiteur de l'activité des ALDH1 et 3 (DIMATE, développé par la société Advanced BioDesign, Saint Priest, France). Le DIMATE induit une augmentation de la mort cellulaire et une diminution des capacités d'autorenouveauement des 3 sphéroïdes (Figure 30C). Afin de déterminer le potentiel radiosensibilisant de l'inhibition de l'activité ALDH, l'efficacité de la combinaison du DIMATE à la radiothérapie a été mesurée. En combinaison avec de la radiothérapie, le DIMATE induit la mort cellulaire plus rapidement (U-CH12 : $p < 0,01$; U-CH1 $p > 0,05$; CH22 : $p > 0,05$) et inhibe les capacités d'autorenouveauement plus fortement (44, 8, 5 colonies restantes avec DIMATE à 1, 10 et $25\mu\text{M}$, 2 Gy RX)) que lorsqu'il est utilisé en monothérapie (113, 78, 25 colonies restantes DIMATE à 1, 10 et $25\mu\text{M}$; $p < 0,01$) (Figure 30C).

Ainsi la combinaison de DIMATE et de radiothérapie a des effets non seulement cytostatiques, mais aussi cytotoxiques et restaure la radiosensibilité des sphéroïdes de chordome.

Cette évaluation d'une approche thérapeutique a permis de montrer d'une part la validité du ciblage des ALDH dans le chordome, et d'autre part l'utilité des modèles de sphéroïdes pour l'évaluation de cibles thérapeutiques (Figure 31).

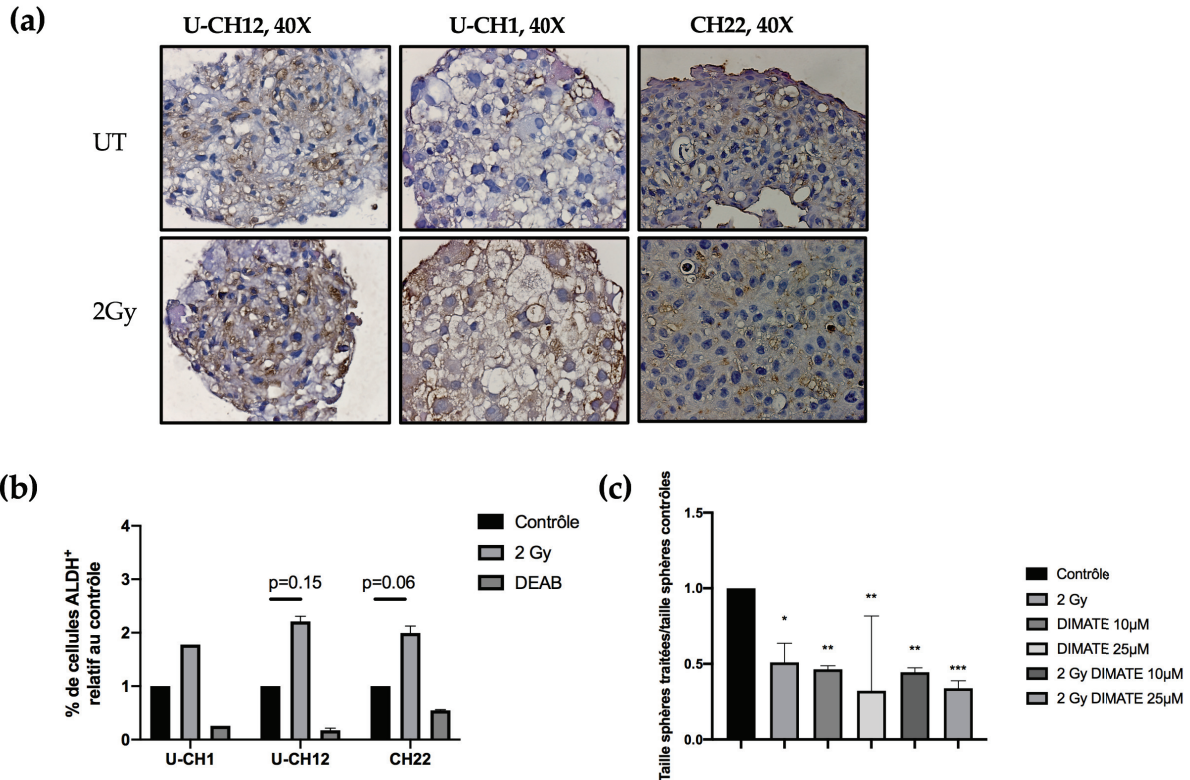


Figure 30- L'ALDH est une cible thérapeutique potentielle dans le chordome- (a) Images représentatives d'un marquage de la protéine ALDH3A2 en conditions contrôle ou après une irradiation (2Gy rayons X). (b) Graphe représentatif du % de cellules à activité ALDH+ relatif au contrôle en conditions contrôle ou après une irradiation. (c) Graphe représentatif de la taille des sphères en conditions contrôle ou après irradiations seules, traitement au DIMATE seul, ou combinaison de ces deux traitements. La comparaison entre les groupes contrôle et traités a été réalisé par un test ANOVA à deux composantes. Les p-values significatives sont indiquées comme suit : $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****.

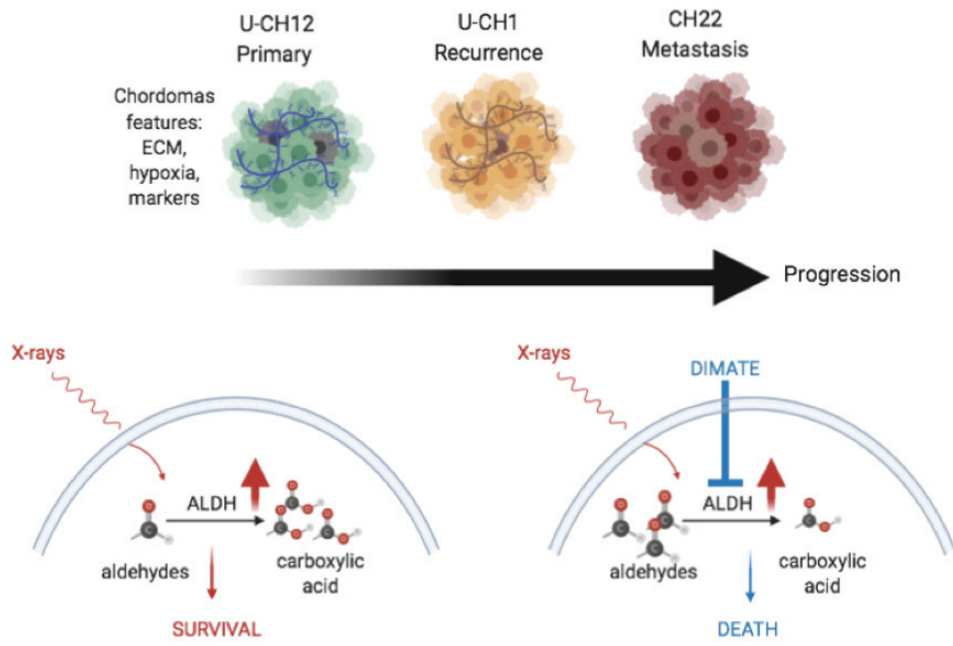


Figure 31- Résumé graphique du travail

PARTIE 3 Publication

Article

Aldehyde Dehydrogenase, a Therapeutic Target in Chordoma: Analysis in 3D Cellular Models

Marie-Anaïs Locquet ¹, Anne-Lise Dechaume ¹, Paul Berchard ¹, Lhorra Abbes ¹, Daniel Pissaloux ^{2,3}, Franck Tirode ³, Inès Ramos ¹, Julie Bedoucha ¹, Julie Valantin ^{4,5}, Marie Karanian ^{2,3}, Raul Perret ⁶, Olivier Gille ⁷, Jean-Yves Blay ^{1,8} and Aurélie Dutour ^{1,*}

1. Team Cell Death and Pediatric Cancer, Cancer Initiation and Tumor cell Identity department, INSERM1052, CNRS5286, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, F-69008, France; Marieanais.locquet@lyon.unicancer.fr (M.-A.L.); Annelise.dechaume@lyon.unicancer.fr (A.-L.D.); Paul.berchard@lyon.unicancer.fr (P.B.); Lhorra.abbes@lyon.unicancer.fr (L.A.); ines.laurentamos@gmail.com (I.R.); julie.bedoucha@gmail.com (J.B.); Jean-yves.blay@lyon.unicancer.fr (J.-Y.B.)
 2. Department of Biopathology, Centre Leon Berard, Lyon, F-69008, France; Daniel.pissaloux@lyon.unicancer.fr
 3. Team Genetics, Epigenetics and Biology of Sarcomas, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM1052, CNRS5286, Cancer Research Center of Lyon, Centre Leon Berard, F-69008, Lyon, France; Franck.tirode@lyon.unicancer.fr (F.T.); Marie.karanian@lyon.unicancer.fr (M.K.)
 4. Research Pathology Platform, Department of Translational Research and Innovation, Centre Leon Berard, Lyon, F-69008, France
 5. Fondation Synergie Lyon Cancer, Lyon, F-69008, France; Julie.valantin@lyon.unicancer.fr
 6. Department of Biopathology, Institut Bergonié, Bordeaux, F-33000, France; r-perret@bordeaux.unicancer.fr
 7. Orthopedic Spinal Surgery Unit 1, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, F-33000, France; Olivier.gilles@chubordeaux.fr
 8. Medical Oncology Department, Centre Leon Berard, Lyon, F-69008, France
- * Correspondence: Aurelie.dutour@lyon.unicancer.fr

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Last-name, F. Title. *Cells* **2021**, *10*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic editor: Harmen J.G. van de Werken

Received: 16 December 2020
Accepted: 8 February 2021
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Chordomas are rare, slow-growing tumors of the axial skeleton. These tumors are locally aggressive and refractory to conventional therapies. Radical surgery and radiation remain the first-line treatments. Despite these aggressive treatments, chordomas often recur and second-line treatment options are limited. The mechanisms underlying chordoma radioresistance remain unknown, although several radioresistant cancer cells have been shown to respond favorably to aldehyde dehydrogenase (ALDH) inhibition. The study of chordoma has been delayed by small patient cohorts and few available models due to the scarcity of these tumors. We thus created cellular 3D models of chordoma by using low-adherence culture systems. Then, we evaluated their radiosensitivity using colony-forming and spheroid size assays. Finally, we determined whether pharmacologically inhibiting ALDH increased their radiosensitivity. We found that 3D cellular models of chordoma (derived from primary, relapse, and metastatic tumors) reproduce the histological and gene expression features of the disease. The metastatic, relapse, and primary spheroids displayed high, medium, and low radioresistance, respectively. Moreover, inhibiting ALDH decreased the radioresistance in all three models.

Keywords: chordoma; 3D models; hypoxia; radiotherapy; aldehyde dehydrogenase; radioresistance; combination therapy

1. Introduction

Chordomas are rare bone tumors of the axial skeleton that localize preferentially in the cranial and the sacral areas. With an incidence of 700 new cases per year, chordomas account for 1–4% of bone tumors and 20% of spinal tumors [1]. These tumors, thought to arise from embryonic remnants of the notochord, can affect people at any time through life even if the median age at diagnosis is between 50 and 60 years [2,3]. Conventional

chordomas possess some peculiar characteristics. They are slow growing tumors and are locally aggressive, invading surrounding structures including the bone and often compressing important structures such as cranial nerves or the spinal cord [4]. They are almost avascular, leading to strong hypoxia, and are composed of large, vacuolated, physaliphorous cells surrounded by an abundant mucoid extracellular matrix [5].

As in the vast majority of bone sarcoma, chordoma patient management consists of surgical resection of the tumor [6]. The goal of resection is to obtain adequate margins, and the quality of surgery is the most important prognostic factor [4]. However, resection with adequate margins is achieved in roughly 50% of cases, mainly due to the location of the tumor in the vicinity of important structures [4]. In the case of inadequate margins, neoadjuvant therapy is combined with surgery. Among all neoadjuvant therapies, high-dose conventional radiotherapy remains the only option, with doses superior to 70Gy [7,8]. Despite its low accessibility, proton therapy can be useful because it allows the delivery of a more important dose to a tumor without exposing surrounding tissues to excessive toxicity [9]. Despite this aggressive treatment, the 5-year relapse-free survival rate is only 50% [8]. Treatment options are limited at relapse due to the invasiveness and toxicity of the first-line treatment. Hence, there is a need for therapies addressing chordoma specificities. To achieve this, a better understanding of chordoma biology and of the mechanisms underlying chordoma radioresistance is of utmost importance. Decreasing the radioresistance of these tumors could decrease the toxicity triggered by radiations, could improve patient care, and could improve tumor control. The scarcity of these tumors makes large-scale molecular studies challenging, and only a few molecular alterations have so far been described [10]. Although the causes of radioresistance in chordoma are still largely unknown, several factors may be involved. Indeed, hallmarks of these tumors are their slow growth and their low number of mitotic cells, which are the principal targets of radiotherapy [11]. Moreover, the low level of vascularization leads to strong hypoxia, which represents a major predictive factor of unfavorable tumor response to radiotherapy [12,13].

To improve our understanding of the mechanisms underlying chordoma radioresistance, we need to reconstitute the peculiar characteristics of these tumors. Because of their scarcity, only a few models of these tumors are available: 20 cell lines and 11 patient-derived xenograft models. Moreover, cells grown in 2D do not reflect some of the major characteristics of chordoma such as hypoxia, extracellular matrix production, and disease progression [14]. To address these issues, we hypothesized that creating cellular 3D models of chordoma could improve our understanding of the mechanisms of radioresistance. Thus, the aims of our study were i) to create cellular 3D models of chordoma that reproduce their histological and morphological features, ii) to evaluate their resistance to radiations, and iii) to determine whether a radiosensitizing approach could be applicable. In this regard, we tested the effectiveness of targeting aldehyde dehydrogenases (ALDHs) 1 and 3. Indeed, ALDHs are a family of enzymes involved in cell detoxification [15]. They oxidize a wide range of endogenous and exogenous aldehydes and protect living organisms from oxidative stress [6]. A high ALDH activity has already been correlated with resistance to treatment in multiple solid tumors. For instance, ALDH-positive breast cancer cells are radioresistant *in vitro* [16,17]. ALDH1-positive cells exhibit a radioresistant phenotype enhanced with hypoxia in cervical cancer [18]. ALDH activity promotes radioresistance in prostate cancer progenitor cells [19] and is indicative of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) radioresistant cells [20]. This is also the case for bone sarcoma, in which a high ALDH activity is associated with chemotherapy-resistant Ewing sarcoma cells [21]. A population of cells with a high ALDH activity is known to be present in both chordoma patients [22] and cell lines U-CH1 [23], U-CH2, UM-Chor1 [24], and JHC7 [25]. Moreover, the inhibition of ALDH decreases the radioresistance of breast, prostate, and cervical cancer cells [26–28]. Collectively, these findings suggest a central role for ALDH in cellular resistance to radiations. However, the involvement of ALDH in radioresistance has never been studied in chordoma.

Hence, we created cellular 3D models of chordoma by using ultra-low adherence culture systems. We evaluated their radiosensitivity and determined whether pharmacologically inhibiting ALDH1/3 decreased the radioresistance of our models.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Lines

2.1.1. Cultures

Conventional chordoma cell lines U-CH12, U-CH1, and CH22 established from primary, relapse, and metastatic chordoma, respectively, were kindly provided by the Chordoma Foundation (Durham, NC, USA). The U-CH1 and U-CH12 cell lines were maintained in 2D cultures on rat tail collagen I-coated flasks (A1048301, Thermofisher, Illkirch, France) in Iscove Modified Dulbecco Media (IMDM):Roswell Park Memorial Medium (RPMI) 4:1 medium (Life technologies, Carlsbad, California) supplemented with insulin, transferrin, and selenium 1% (ITS, Life technologies) for U-CH12. The CH22 cell line was maintained on non-coated flasks in RPMI medium. All media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin streptomycin (PS).

2.1.2. Cell Culture Conditions and Treatments

Chordoma spheroids were generated by seeding 2500 cells from either cell lines in 96 ultra-low attachment (ULA) plates (Corning® Costar®, Brumath, France) in the same media as used for 2D cultures. Once seeded, spheroid formation was examined twice a week under an optical inverted microscope (Zeiss, Göttingen, Germany). Spheroids were allowed to form for 7 days before being treated either with radiation or an ALDH inhibitor. A 2 Gy radiation dose was applied to spheroids (dose rate of 6 Gy min⁻¹) with a 6 MeV X-ray clinical irradiator (SL 15 Phillips). The irreversible inhibitor of ALDH1 and ALDH3, DIMATE (Advanced BioDeisgn, Saint Priest, France), was added to spheroids for 24 to 72 h (concentrations range: 0.1 to 25 µM).

2.2. Proliferation Assay

Spheroid proliferation was assessed at days 4, 7, 10, 15, and 21 by CellTiter-Glo® luminescent cell viability assay (CTG) (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Each spheroid was washed with PBS1X and incubated with 60 µL of CTG in a medium devoid of serum (ratio 1:1). Luminescence was detected after 25 min of incubation on a TECAN Infinite 500 reader (TECAN, Männendorf, Switzerland) for 500 ms/well. After 48 h of treatment, spheroid proliferation in response to increasing concentrations of DIMATE (0.1 to 25 µM) was measured by Cell Titer Glo to determine DIMATE IC50.

2.3. Real-Time Monitoring

Spheroid proliferation was also determined using real-time monitoring with an InCuCyte Live Cell Analysis System (IncuCyte ZOOM, Essen Bioscience, West Wickham Kent BR4 OPH, United-Kingdom). Spheroid diameters were measured using the InCuCyte software. Spheroid cell death induced by radiation and/or DIMATE treatment was monitored in real-time using the InCuCyte. Irradiated and/or DIMATE-treated spheroids were incubated with 50 µL of Cytotox Green reagent (4633, Essen Bioscience) in phenol red-free medium according to the manufacturer's instructions and placed under the 20× objective lens of the InCuCyte Live Cell Analysis System over a period of 48 h. The evolution of Cytotox Green fluorescence intensity was then analyzed with the InCuCyte software.

2.4. Immunostaining

Spheroids were harvested at day 7, 10, 15, and 21 after seeding; fixed in eosin 1:100 and PFA 4% (2 h, 4 °C); embedded in paraffin before cutting into 5 µm sections; and stained. HPS and Ki67 staining were performed on an automated Ventana Discovery XT

staining system (Ventana Medical Systems, Innovation PARK Drive, Tucson, Arizona 85,755 USA, Roche). The Ki67 index was assessed semi-quantitatively. For hypoxia staining, the sections were incubated with pimonidazole (100 µg/mL for 1 h at room temperature (RT) (Hypoxyprobe, Massachusetts, USA) before fixation.

After the deparaffination, rehydration, and antigen retrieval steps (citrate buffer, pH 6.0, 95 °C, 15 min or Tris EDTA, 95 °C, 15 min), the slides were incubated overnight (4 °C) with the following primary antibodies: anti-brachyury(1:500), anti CD24 (1:100), 4-hydroxynonenal (Abcam, Cambridge, United Kingdom), anti-cytokeratin AE1/AE3 (1:100), anti EMA (1:250) (Dako, Agilent, Santa Clara, United States), anti γH2AX (1:500) (Cell signaling technology, Leyde, Netherland), anti HIF-1α (1:100), anti-ALDH3A2 (1:100) (Proteintech, Manchester, United Kingdom), or anti-pimonidazole (Hypoxyprobe). Endogenous peroxidases were inactivated by incubating the slides in oxygen peroxide (0.3%, 15 min, RT). The primary antibodies were detected with biotinylated goat anti-rabbit or goat anti-mouse secondary antibody (VectorLab, Burlingame, United States, 1:100, 1 h, RT) followed by an avidin-biotin complex and DAB peroxidase (SK-4100, Vector Lab; dilution 1:300, 30 min, RT). The sections were counterstained in hematoxylin (Vector Lab, H3401) and mounted in Vectamount medium (H-5000). For aldehyde staining, the sections were incubated with secondary antibody (goat anti-mouse Alexa fluor 488, Abcam, 150113) and DAPI (1:1000, Abcam, 228549) for 1 h at RT. The sections were then mounted on slides using Fluoromount (Sigma, Merck, Darmstadt, Germany). For extracellular matrix staining, the slides were incubated with alcian blue (Sigma, B8438) and sirius red (Sigma, 2610) for 10 min at RT. The sections were washed and counterstained with fast red or hematoxylin, respectively. All slides were examined under a Zeiss Axioimager M2 microscope (SIP 60549, Zeiss, Göttingen, Germany), and quantifications were made using the ImageJ software.

2.5. Electron Microscopy

Spheroids were fixed in buffered aldehyde (4% formaldehyde, 2% glutaraldehyde, 1 mM MgCl₂, and 1 mM CaCl₂ in 100 mM Ca-cacodylate, pH 7.2), post-fixed in aqueous 1% osmium tetroxide, and then dehydrated in graded steps of ethanol. The spheroids were impregnated in Epon A (50%), Epon B (50%), and DMP30 (1.7%) and were included for polymerization (60 °C, 72 h). The spheroids were cut in ultrathin 70 nm sections before being contrast-stained with lead-citrate and uranyl acetate and imaged with a Jeol 1400JEM (Tokyo, Japan) transmission electron microscope at the CIQLE (Centre d'Imagerie Quantitative Lyon Est).

2.6. Self-Renewal

Self-renewal of the chordoma spheroids was assessed by colony formation assays and spheroid size assays. After irradiation and/or DIMATE treatment, the spheroids were maintained 24 h in culture before being dissociated using the TryPLE reagent (5 min, 37 °C, ThermoFisher, Illkirch, France) followed by gentle pipetting to obtain single cell suspensions.

Two thousand or five thousand cells were seeded onto 6-well plates and were allowed to form colonies for 5 doubling times (2 weeks for CH22, 5 weeks for U-CH12, and 7 weeks for U-CH1). The colonies were counterstained with a solution of ethanol 75% crystal violet (Sigma, V5265) and counted using the ImageJ software. To perform a spheroid size assay, 200 single cells were seeded in ULA 96-well plates and were allowed to form spheres for 15 days. All spheres (>50 µm) in a well were manually imaged, counted, and measured (diameter) using a Zeiss Axio Observer Z1 inverted microscope (Zeiss, Göttingen, Germany).

2.7. Aldefluor Assay

ALDH enzymatic activity was measured using the Aldefluor kit (Stem Cell Technologies). The cells suspended in Aldefluor assay buffer were incubated with an ALDH

enzyme substrate for 40 min at 37 °C. As a control for baseline fluorescence, the cells were also treated with ALDH inhibitor diethylaminobenzaldehyde (DEAB). The cells were washed and stained with viability dye (Miltenyi Biotec, Paris, France) at 1:1,000. Fluorescence was detected using a BD Bioscience LSR Fortessa flow cytometer and analyzed using the FACSDiva software (BD Biosciences, San Jose, CA, United-States).

2.8. RNA Sequencing

RNA sequencing was performed for both spheroids after 7 days of culture and patient samples. Total RNA was extracted from macro-dissected formalin-fixed paraffin-embedded tumor sections using the FormAPure RNA kit (Beckman Coulter #C19158, Brea, CA, USA). The RNase-free DNase set (Qiagen #AM2222, Courtaboeuf, France) was used to remove DNA. RNA quantification was assessed using NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) measurement and RNA quality using the DV200 value (the proportion of RNA fragments larger than 200 nt) assessed by a TapeStation with Hs RNA ScreenTape (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Samples with sufficient RNA quantity (>0.5 µg) and quality (DV200 > 30%) were further analyzed by RNA sequencing. One-hundred nanograms of total RNA were used to prepare libraries with the TruSeq RNA Exome (Illumina #20020183, San Diego, USA). Twelve libraries were pooled at a concentration of 4 nM each, together with 1% PhiX. Sequencing was performed (paired end, 2 × 75 cycles) using NextSeq 500/550 High Output V2 kit on a NextSeq 500 machine (Illumina).

Alignments were performed using STAR on the GRCh38 version of the human reference genome. The number of duplicate reads were assessed using PICARD tools. No sample was discarded from the analysis (number of unique reads above 10 million). The expression values were extracted using Kallisto version 0.42.5 tool17 with GENECODE release 23-genome annotation based on the GRCh38 genome reference. The Kallisto TPM expression values were transformed in log₂(TPM+2), and all samples were normalized together using the quantile method from the R limma package within R (version 3.1.1) environment. tSNE analysis was performed to visualize the distance between chordoma spheroids, patient samples, and a series of 1450 sarcoma samples with at least 144 molecular subtypes, as previously published [29]. A classic differential gene expression analysis was conducted between chordoma samples and spheroids.

2.9. Patients Samples and Ethics

The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Centre Leon Berard, ethical approval number 2018-014, approval date 10/03/2018. A total of 13 patients with conventional chordoma were included in the study. The clinical informations are presented in Table 1.

Table 1. Patients clinical informations

Age	Sex	Tumor Location		Treatment	Local Relapse or Metastasis
84	F	Sacrum	Primary	Surgery	No
77	F	Sacrum	Primary	Surgery	No
70	M	Sacrum	Primary	Surgery	Local relapse
59	F	Sacrum	Primary	Surgery	Local relapse
67	M	Sacrum	Primary	No surgery	No
70	M	Sacrum	Primary	No surgery	No
56	M	Sacrum	Primary	Surgery	No
36	M	Sacrum	Primary	RT	No
66	M	Sacrum	Primary	Surgery	No
72	F	Sacrum	Primary	Surgery	No
57	M	Sacrum	Primary	Surgery	No
40	M	Crane	Metastasis	No surgery	No

2.10. Statistical Analysis

GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) v8.0 was used for the graphic representation and statistical analysis of the data. The comparison between groups in all experiments was determined using analysis of variance in GraphPad v8.0. Tukey's test or Sidak's test were used in the post analysis for one-sided and two-sided statistical analyses, respectively. The differences were considered significant if the p -value was ≤ 0.05 .

3. Results

3.1. Chordoma Spheroids Recapitulate the Main Histological and Morphological Features of the Disease

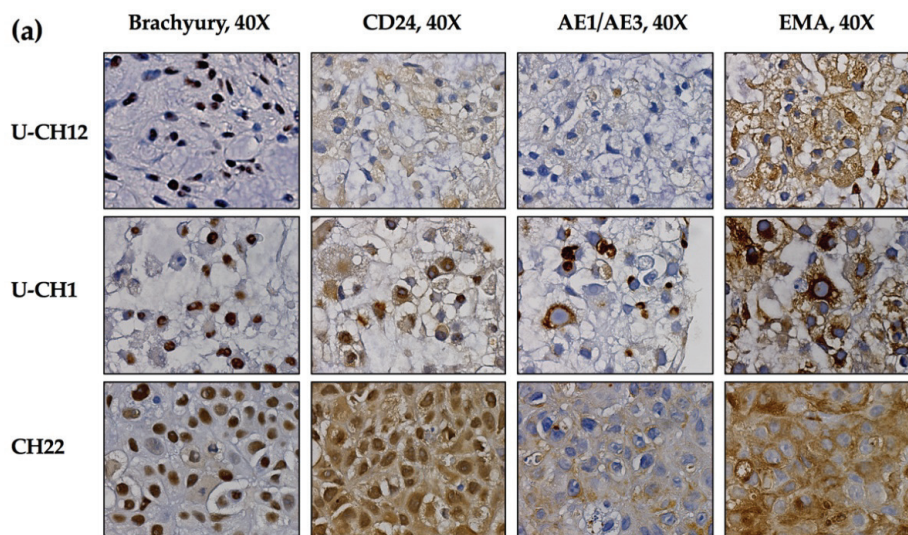
Because the few available cellular models of chordoma do not fully recapitulate the structures of these tumors, we generated 3D cellular models of chordoma originating from three cell lines representative of the three different stages of the disease: i) primary tumor U-CH12, ii) locally relapsed tumor U-CH1, and iii) metastatic tumor CH22. We first investigated whether these spheroids faithfully reproduced the most prominent histological and morphological features of the disease.

At the histological level, all three spheroid models expressed the chordomas markers Brachyury, CD24, cytokeratins, and EMA (Figure 1a). While EMA was strongly expressed by the three chordoma spheroid models, Brachyury and CD24 were highly expressed by the CH22 and U-CH1 spheroids and the U-CH12 spheroids displayed a low expression level. Finally, the CH22 spheroids alone presented a high expression of cytokeratins (Figure 1a).

Morphologically, consistent with the physaliphorous phenotype of chordoma, spheroid cytoplasm included large vacuoles. Their cytoplasm also held glycogen granules, small aggregates of tonofilaments, and rough endoplasmic reticulum around the mitochondria (Figure 1b). All spheroids presented prominent surface filopodia. At the cellular level, CH22 spheroids were characterized by very cohesive cells CH22, joined by tight junctions, whereas U-CH1 and U-CH12 spheroids were less cohesive, only displaying zones of contact between cells (Figure 1b).

Hence, the 3D spheroid models generated recapitulated the main histological and morphological features of chordoma.

Finally, to confirm the validity of our models, we performed RNA sequencing on a cohort of 13 patients and on our spheroids and compared their repertoire of expression to 1450 sarcoma samples, forming at least 144 molecular subtypes. Visualization by tSNE clearly showed that patient samples clustered close to our spheroid samples (Figure S1A). Moreover, a differential gene expression analysis was conducted, highlighting the close relationship between chordoma samples and spheroids (Figure S1B and Table S1 and S2). These results strongly reinforce the validity of our models.



	Brachyury	CD24	Cytokeratins	EMA
U-CH12	+	++	+	+++
U-CH1	++	++	++	+++
CH22	+++	+++	++	+++

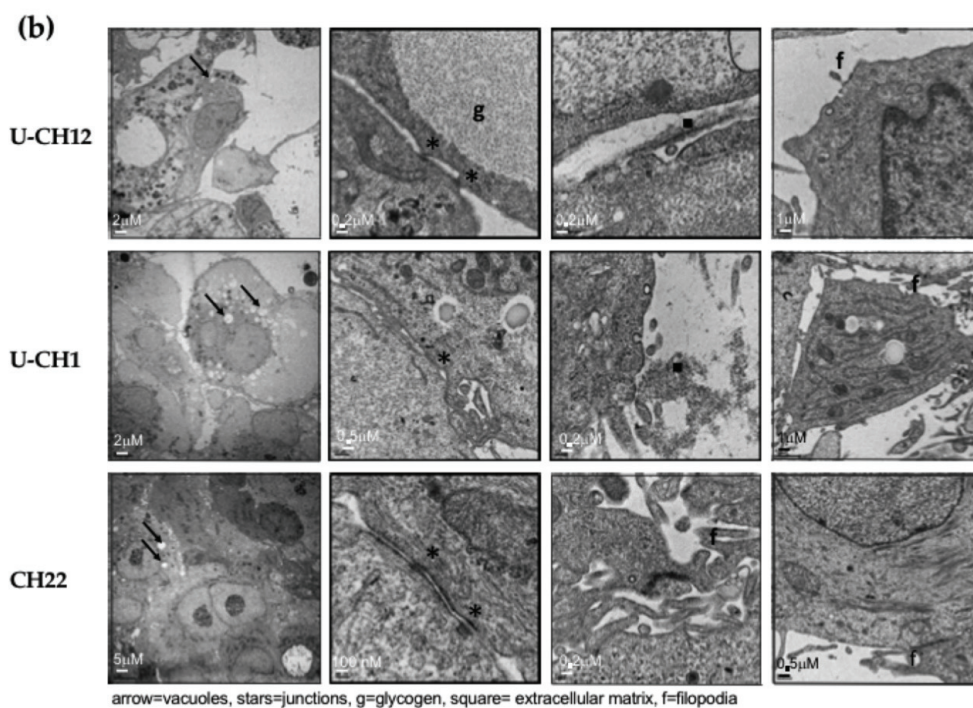


Figure 1. Chordoma spheroids recapitulate the main histological and morphological features of the disease: at 7 days of culture, (a) chordoma markers brachyury, CD24, cytokeratins AE1/AE3, and EMA (40× objective) and their quantification were immunostained and (b) spheroid morphology was imaged by an electron microscopy. The arrows represent

vacuoles, the stars represent junctions, the squares represent the extracellular matrix, f is the filopodia, and g is the glyco-gen granules.

3.2. Chordoma Spheroids Recapitulate the Radioresistant Environment of the Disease

Other chordoma characteristics are the presence of a mucoid extracellular matrix, a strong hypoxia, and a slow progression, at least in their localized form. We then investigated whether our chordoma spheroids present these features.

The presence and composition of ECM in chordoma spheroids was analyzed by sirius red and alcian blue staining, enabling us to visualize collagen and proteoglycans, two major ECM components. Two spheroids U-CH12 and U-CH1 produced their own ECM (Figure 2a). U-CH12 ECM was rich in collagen fibers, as shown by a more intense sirius red staining, while both U-CH1 and U-CH12 spheroid ECMs contained abundant proteoglycans, as evidenced by alcian blue staining (Figure 2a).

Next, we evaluated spheroid growth by measuring their area over a period of 21 days through live imaging (Figure 2b). CH22 spheroids reached a size of 180 mm² on day 4 to 740 mm² on day 21 ($p < 0.0001$). U-CH1 spheroids were less proliferative ($p < 0.001$) and grew from 190 mm² on day 4 to 530 mm² on day 21 ($p < 0.0001$). The slowest proliferating spheroids were U-CH12 ($p < 0.0001$), growing from 100 mm² on day 4 to 180 mm² on day 21 ($p < 0.0001$). This finding was confirmed via a cell survival assay. CH22, U-CH1, and U-CH12 showed an increased number of live cells during the 21 days ($p < 0.0001$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively) with three different kinetics. Indeed, CH22 was the most proliferative (from 1.5 luminescence fluorescence intensity (LFI) on day 4 to 6.25 LFI on day 21) and reached a peak of proliferation between day 7 and day 10. U-CH1 were less proliferative than CH22 and proliferated uniformly (1.4 to 3.5 LFI). U-CH12 were the least proliferative spheroids (0.52 to 1.3 LFI) and showed decreased proliferation after day 15 (Figure 2c). Finally, Ki67+ quantification revealed 13.4%, 31.5%, and 42.1% of proliferative U-CH12, U-CH1, and CH22 cells, respectively (Figure 2d).

These patterns of proliferation are representative of the slow growth and progression of chordomas.

Since hypoxia is both a major characteristic of chordomas and a cause of radiotherapy failure, we mapped the hypoxic regions within spheroids using pimonidazole and HIF-1 α staining (Figure 2e). These hypoxic regions were localized at the center of all spheroids and exhibited a nuclear HIF-1 α staining (Figure 2f). Hence, we succeeded in reproducing the hypoxic status of chordoma tumors in our spheroids.

Altogether, these results indicate that our cellular models recapitulate the production of ECM, the slow growth, and the hypoxic status of chordoma, thus mimicking a radioresistant environment.

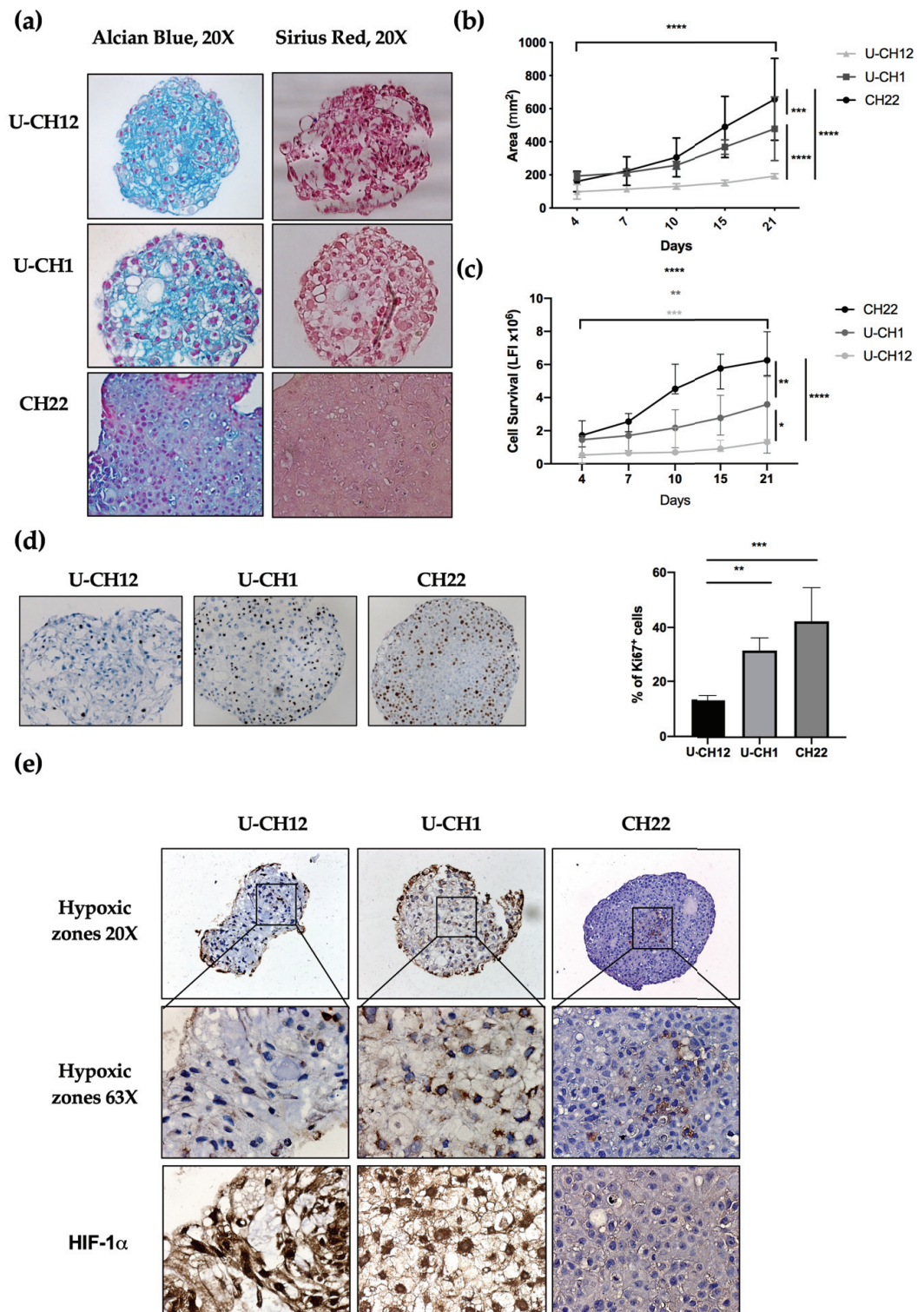


Figure 2. Radioresistant chordoma spheroid environment: at 7 days of culture, (a) extracellular matrix components were immunostained, including proteoglycans with alcian blue and collagen with sirius red (20 \times objective). (b) The graph represents the median and confidence interval at 95% of the measure of the area of spheroids using live imaging from day 0 to day 21 after seeding for each spheroid. (c) The graph represents the median and confidence interval at 95% of the luminescence fluorescence intensity (LFI) correlated with cell survival from day 0 to day 21 after seeding for each spheroid. (d) The number

of proliferative Ki67+ cells was evaluated, and the median and confidence intervals at 95% for each spheroid were quantified. (e) The hypoxic zones within spheroids were mapped by pimonidazole and HIF-1 α staining. Each experiment was conducted in triplicate and repeated three times for spheroid proliferation assessment or twice for extracellular matrix and hypoxia-relative staining. For a comparison of the areas and cell survival, statistical analysis included 2-way ANOVA with time comparison, presented at the bottom of each graph, and cell line comparisons, presented on the right-hand side of the graphs. The comparison of the number of Ki67+ cells between spheroids was determined using a one-way ANOVA analysis. Significant p -values are indicated as follows: $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, and $p < 0.0001$ ****.

3.3. Chordoma Spheroids Exhibit Different Levels of Radioresistance

As a control, we evaluated radiation-induced DNA damage using γ H2AX-stained foci as an indicator of double-stranded breaks after radiation. Thirty minutes after being subjected to 2Gy of X-rays, γ H2AX foci were present in each spheroid, confirming the efficacy of radiation treatment (Figure 3a). Next, we examined the therapeutic effect of radiotherapy on chordoma spheroid self-renewal and proliferation. A dose of 2Gy of X-rays resulted in a decrease in the colony forming ability of CH22 compared to that of untreated spheroids (UT: 132 colonies; 2Gy: 40 colonies), with only 30% of colonies remaining after radiation ($p < 0.001$) (Figure 3b,c). In contrast, 2Gy of X-rays slightly affected U-CH1 and U-CH12, with no significant difference in the number of colonies formed after treatment (UT: 40; 2Gy: 24; UT: 215; and 2Gy: 197, respectively) (Figure 3b,c). We then evaluated the sphere forming ability of spheroids after radiation to verify the impact on our 3D model (Figure 3d). After two weeks, the spheres newly formed from irradiated CH22 spheroids ($597,609 \mu\text{m}^2$) had a smaller area than the spheres formed from untreated CH22 spheroids ($2.10^6 \mu\text{m}^2$; $p < 0.01$) (Figure 3d,e). However, the area of spheres formed from 2Gy-treated spheroids from both U-CH1 and U-CH12 ($224,048 \mu\text{m}^2$; $300,000 \mu\text{m}^2$) displayed no significant difference compared to the area of spheres formed from untreated U-CH1 and U-CH12 spheroids ($198,444 \mu\text{m}^2$; $286,742 \mu\text{m}^2$) (Figure 3 d,e).

Hence, our 3 spheroids show 3 different levels of radioresistance, with U-CH12 being the most radioresistant and CH22 being the least.

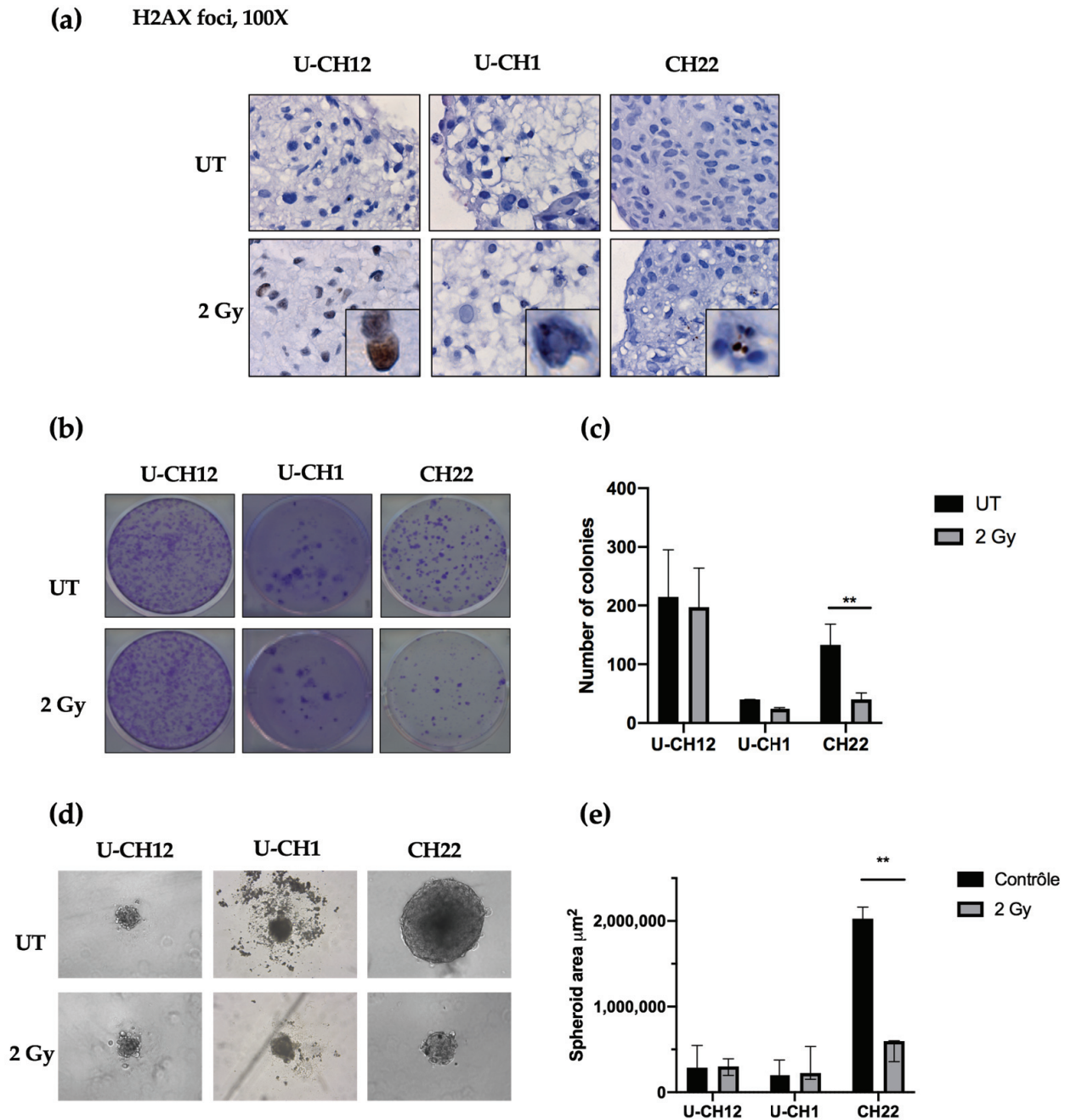


Figure 3. Chordomas exhibit three different levels of radioresistance: (a) DNA double-stranded breaks induced by radiation and quantified using γ H2AX foci staining, (b) images and (c) a graph representative of the number of colonies formed in untreated conditions or after 2 Gy of X-rays, and (d) images and (e) a graph representative of the spheroid size in untreated conditions or after 2 Gy of X-rays. Each experiment was repeated three times in triplicate. Comparisons between untreated and radiation-treated groups were analyzed with a two-way ANOVA. Significant p -values are indicated as follows: $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, and $p < 0.0001$ ****.

3.4. Aldehyde Dehydrogenase Activity is a Potential Target in Chordoma

Aldehyde dehydrogenases are a family of detoxifying enzymes involved in radioresistance of multiple solid tumors. We initially determined whether ALDHs could be

potential targets in chordoma by investigating their gene expression using RNA sequencing. A cohort of 13 patients with sacral chordoma, and both U-CH1 and CH22 spheroids were analyzed. We observed that the members of the ALDH3 and ALDH1 families were the most expressed at the transcriptomic level in all samples. Indeed, patient samples and spheroids presented high expression values of ALDH3B1, ALDH3A2, and ALDH1A2 (9, 8, and 7, respectively) (Figure 4a).

Next, we focused on the most expressed ALDH enzymes, namely ALDH1 and ALDH3. We investigated whether these enzymes are expressed in chordoma spheroids at the proteomic level. ALDH3 expression was first examined by immunostaining, which revealed that all untreated spheroids moderately expressed ALDH3. This expression increased exclusively in U-CH1 spheroids after radiation (Figure 4). We then evaluated the activity of ALDH1 and ALDH3 in spheroids by flow cytometry using an Aldefluor assay (Figure 4c–e). We used the *N,N*-diethylaminobenzaldehyde (DEAB) inhibitor of ALDH isoenzymes, as a negative control. These analyses showed that, at the basal level, a small subset of cells present high ALDH activity (U-CH12: 9.5%; U-CH1: 6.16%; and CH22: 3.53%). This subset of cells augments in response to radiation (U-CH12: 21%; U-CH1: 10.96%; and CH22: 7.5%) (Figure 4c), as evidenced by the 2.2-fold increase in ALDH^{high} U-CH12 cells upon irradiation (U-CH12: 2.2, $p = 0.15$; CH22: 1.9, $p = 0.06$; and U-CH1: 1.8) (Figure 4d). Interestingly, the most radioresistant spheroids, namely U-CH12 spheroids, present the most important population of cells with a high ALDH activity.

Altogether, these results show that aldehyde dehydrogenases are expressed both at the transcriptomic and the proteomic levels in chordoma patients and spheroids. Furthermore, there is an enrichment in cells with ALDH^{high} activity after radiation. Hence, ALDH1 and ALDH3 may be promising therapeutic targets in chordoma.

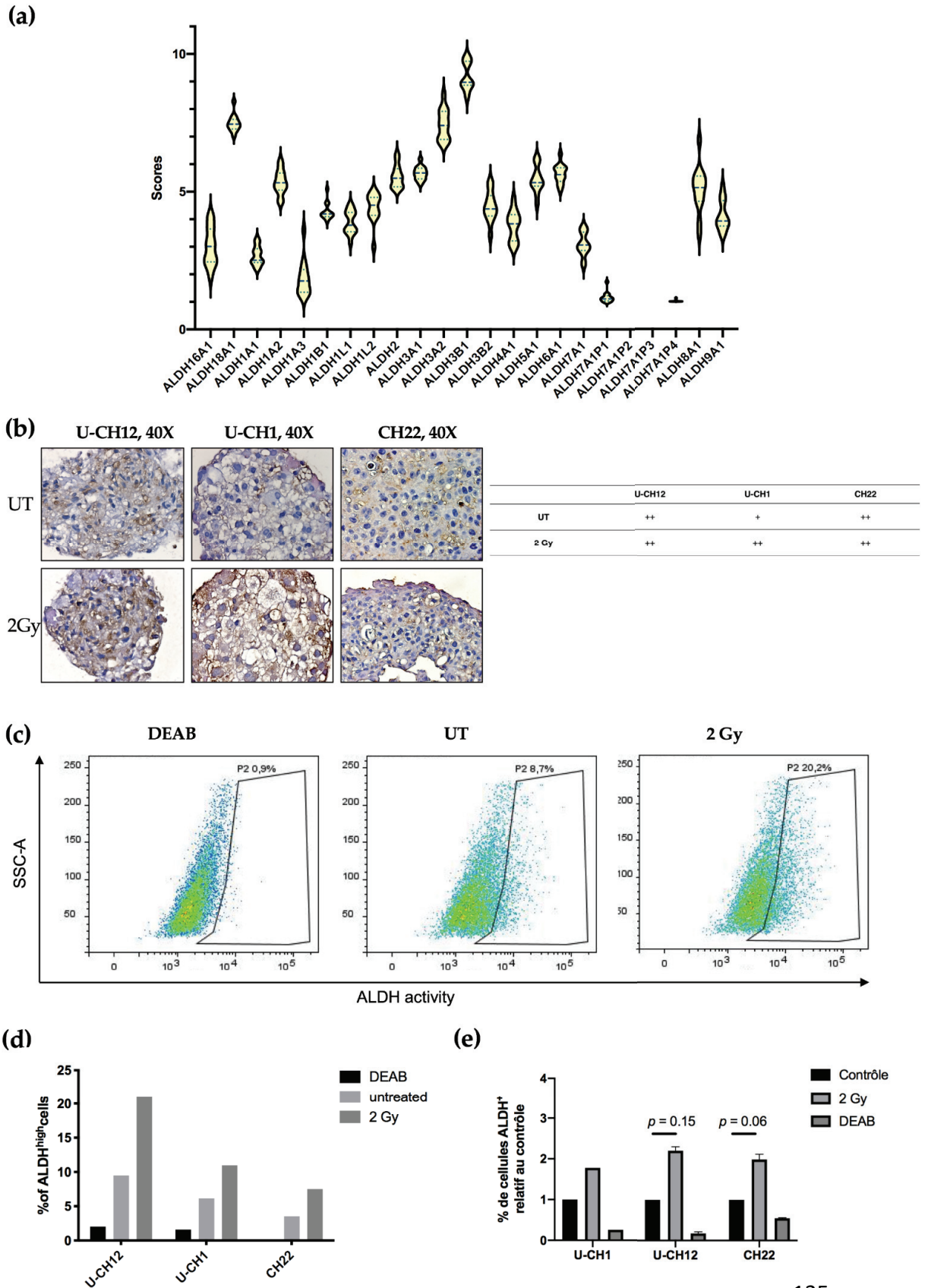


Figure 4. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) is a promising radiosensitizing target in chordoma: (a) a graph representing ALDH gene expression scores in 13 chordoma patients, (b) representative images of ALDH3A2 staining after 2 Gy of X-rays or in untreated controls and quantification, (c) images representative of an Aldefluor assay quantifying ALDH1 and 3 activity in response to 2 Gy of X-rays in U-CH12 spheroids, (d) graph representative of the percent of ALDH^{high} cells, and (e) graph representative of the percent of ALDH^{high} cells relative to untreated conditions. Diethylaminobenzaldehyde (DEAB), an inhibitor of ALDH activity, was used as a negative control. The experiment was performed three times in triplicate for U-CH12 and CH22 spheroids, allowing for a comparison between the UT and 2Gy groups using 2-way ANOVA. The *p*-value is indicated for each spheroid.

3.5. Inhibiting Aldehyde Dehydrogenase Decreases the Radioresistance of all Three Models

We hypothesized that the dual inhibition of ALDH1 and ALDH3 could sensitize radioresistant chordoma cells. We first validated that DIMATE was able to specifically inhibit ALDH1 and ALDH3 by flow cytometry using an Aldefluor assay. Both ALDH1 and ALDH3 activity reduced strongly after DIMATE treatment (Figure S2). The IC₅₀ of DIMATE was then established in chordoma spheroids by treating them with 0.1 to 25 μ M of DIMATE. This IC₅₀ ranged from 1332 μ M in U-CH1 spheroids to 8836 μ M in U-CH12 spheroids (Figure 5a). The combined treatment of DIMATE and radiations was applied to spheroids to evaluate their antiproliferative and anti-self-renewal effects. A strong decrease in colony forming ability was observed with the combination treatment at both 10 and 25 μ M, with only 8 and 5 colonies remaining after treatment compared to 37 colonies remaining after radiation alone ($p < 0.0001$ for both concentrations) (Figure 5b,c). Moreover, the combination at either 1, 10, or 25 μ M induced a decrease in colony forming ability more important (44, 8, and 5 colonies remaining after treatment) than DIMATE alone (113, 78, and 25 colonies remaining after treatment) at the same concentrations ($p < 0.0001$ for all concentrations) (Figure 5b,c). Hence, the combination of DIMATE and radiation triggers a stronger antiproliferative effect. This antiproliferative effect was confirmed in 3D cell cultured conditions by evaluating the capacity of cells to form spheres after the different treatment combinations (Figure 5d,e). Spheres formed from spheroids treated with the combination at 25 μ M displayed a 3 times smaller area (2Gy, D25 μ M = 0.33) compared to the untreated control (UT = 1; $p < 0.0001$) (Figure 5d,e). The capacity to form spheres decreased and the newly formed spheres progressed less rapidly when spheres were formed following the combination treatment compared to those formed from radiation alone, indicative of a strong cytostatic effect.

We then evaluated whether DIMATE, radiation, or their combination induced cell death. Spheroids treated with DIMATE alone or in combination with radiation showed a strong induction of cell death after 24 or 48 h of treatment (U-CH12: $p < 0.01$; U-CH1: $p < 0.05$; and CH22: $p < 0.05$). No significant difference in the induction of cell death was observed between spheroids treated with DIMATE alone or with the combination of DIMATE and radiotherapy for U-CH12 and CH22. However, the treatment combination was more efficient at inducing cell death in U-CH1 spheroids, with a faster induction of cell death (9 h and 12 h of treatment, $p < 0.05$). Moreover, the treatment combination was more effective than radiation alone in all 3 spheroids, 9 h after treatment onwards for U-CH12 and U-CH1 spheroids ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively), and after 15 h of treatment for CH22 ($p < 0.05$) (Figure 5f). Hence, DIMATE exhibited not only cytostatic effects but also cytotoxic effects able to reinduce cell death in combination with radiation. Hence, the inhibition of ALDH1 and ALDH3 reinduced radiosensitivity in chordoma spheroids.

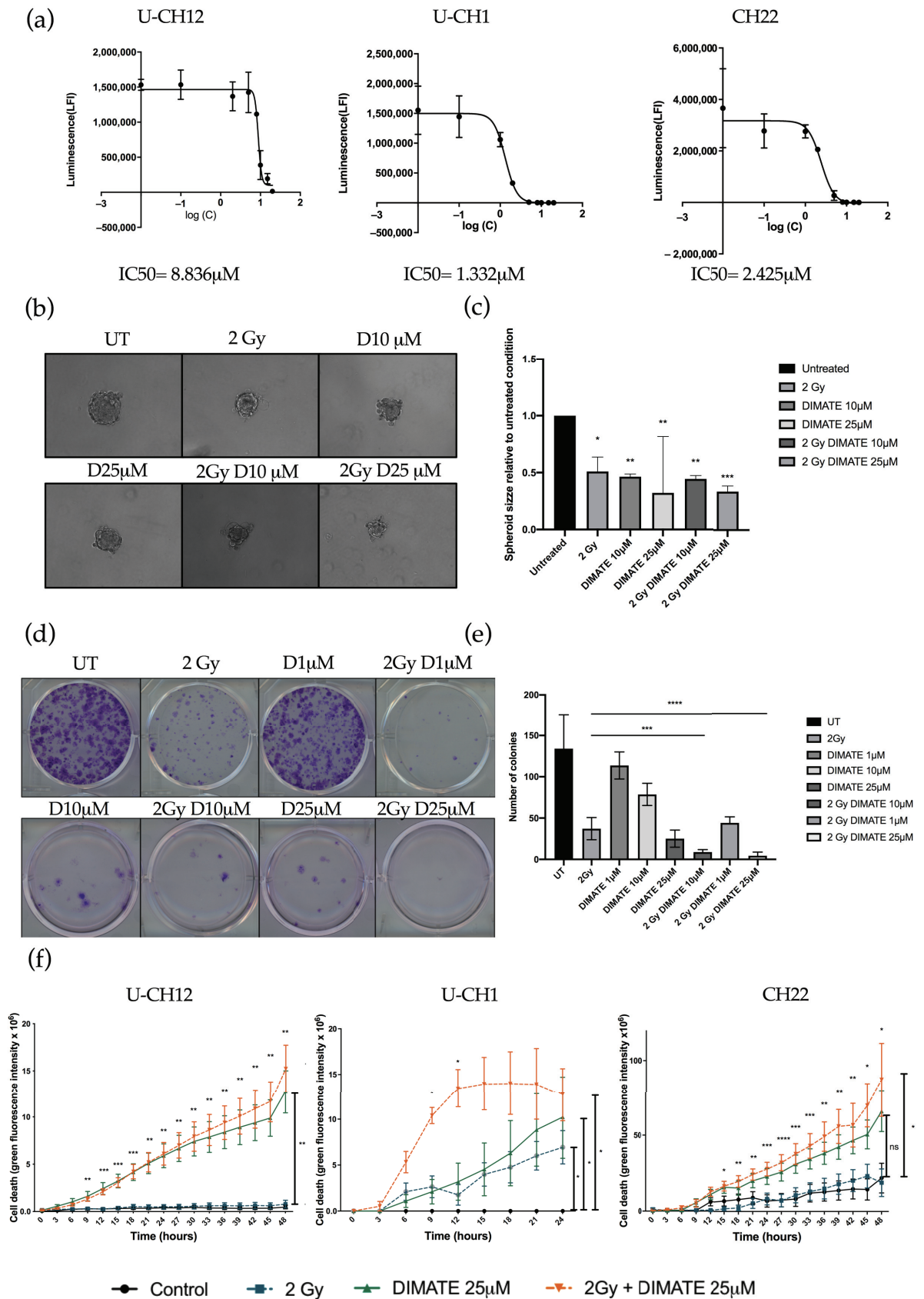


Figure 5. ALDH inhibition decreases radioresistance in chordoma: (a) a graph representative of three independent experiments of DIMATE IC50 in chordoma spheroids after 48 h of treatment at concentrations ranging from 0.1 to 25 μ M, (b) images and (c) a graph representative of the CH22 spheroid size relative to untreated conditions after treatment with X-rays or after a combined treatment with X-rays and DIMATE, (d) images and (e) a graph representative of the number of colonies formed in UT conditions or after treatment with DIMATE as a monotherapy or combined with 2Gy of X-rays in CH22 spheroids, and (f) a graph representative of spheroid cell death over 48 h in UT conditions or after treatment with DIMATE alone or in combination with 2 Gy of X-rays. Each experiment was conducted three times in triplicate. The statistical comparison between each group was determined using a one-way ANOVA. Significant *p*-values are indicated as follows: *p* < 0.05 *, *p* < 0.01 **, *p* < 0.001 ***, and *p* < 0.0001 ****.

4. Discussion

Chordoma patients currently rely on aggressive surgery and high-dose radiotherapy. The infrequency of chordoma has so far delayed and obstructed the development of efficient targeted therapies against these tumors. It has been demonstrated that 95% of the drugs in phase I of clinical trials never obtain FDA approval [30]. In the last decade, efforts have been made to understand this lack of efficacy, which may partly be due to the low predictive value of preclinical models. Indeed, only a few cell lines and patient-derived xenografts (PDX) are available as *in vitro* and *in vivo* models of chordoma. To better predict response to drugs, we thus needed to create models at the crossroad between cell lines and PDXs. In this study, we established, characterized, and used 3D cellular models of chordoma for the preclinical evaluation of a radiosensitizing strategy. First, these models are representative of the histological and immunohistochemical features of the disease. Interestingly, brachyury had higher expression levels in CH22 spheroids than in U-CH12 spheroids. Indeed, brachyury overexpression has been detected in several epithelial cancers and was shown to promote the epithelial-to-mesenchymal transition that enables tumors to metastasize. The levels of brachyury expression have been correlated with disease stage, poor prognosis, and tumor resistance to cytotoxic therapies in a number of cancers [31–34]. In chordoma, brachyury overexpression is also associated with shorter progression-free survival [35]. Thus, the difference in expression of brachyury between primary and metastatic spheroids could be due to the role of brachyury in tumor progression. These models also recapitulate the peculiar radioresistant environment of chordoma and the progression of the disease (primary, relapse, and metastatic).

The current limitations of cell culture are now partially overcome by 3D cell cultures. Three-dimensional cell cultures better mimic the native cancer tissue, since they restore some of the specific biochemical and morphological features seen *in vivo* [36,37]. In our models, important morphological features were observed with the presence of the extracellular matrix in U-CH12 and U-CH1 composed of proteoglycans and collagens. Moreover, while cells are equally exposed to drugs in 2D cultures, in chordoma 3D models, we recapitulated the difficulty of drugs to gain access to tumor cells. Over the last few years, new complex 3D models have emerged, with the most interesting one remaining organoids. Organoids allow us to collect the primary culture of samples from patients and to maintain intra-tumoral heterogeneity [38]. One study has so far reported the establishment of organoid models of chordomas in a preclinical context to predict the response to PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitors [39]. Despite these promising results, a deeper characterization of these primary cell cultures is needed. Chordoma spheroids contain different types of cells: proliferating, quiescent, hypoxic, and mimicking the diversity found within a tumor cell. Moreover, *in vivo* models of chordoma are interesting because they are able to progress. However, owing to the scarcity of chordoma samples and the slow growth rate of these tumors, organoid development has been hindered. Here, we addressed tumor progression by using cell lines established from a primary, a relapsed, and a metastatic tumor from different patients. Finally, our models match the clinical description of chordoma: primary tumors have low cellularity, slow growth, and an abundant extracellular matrix, while metastatic tumors have high cellularity, faster growth, and less extracellular matrixes.

Preclinical *in vivo* models are also of utmost importance to determine the bioavailability of drugs in a living organism. Given the differences between our 3D models, it was not surprising to obtain variable levels of radioresistance, reflecting what is observed in the clinic [6]. As patients with sacral chordomas are radioresistant, they are treated with fractionated high-dose radiotherapy with a maximal dose of 2Gy/per session [6]. We also subjected our models to this dose to mimic clinical settings. To our knowledge, only two studies have so far focused on chordoma radioresistance. The first study demonstrated that U-CH1 cells grown in 2D have a normal radiosensitivity range, whereas we found a strong radioresistance [40]. This difference may be due to an alteration in the cell line used, as the authors kept only one highly dividing subclone. We thus speculate that the quiescent and low dividing subclones must be at the origin of radioresistance in this cell line. Confirming this hypothesis, the second study evaluated the response of the U-CH1 cell line to ionizing radiation and found the same rate of survival at 2Gy of X-rays as ours [41]. The variable degrees of radioresistance found can also be explained by the differences in proliferation, composition of extracellular matrix, and hypoxia. The extracellular matrix is known to increase cell adhesion and drives radioresistance. Moreover, hypoxia is a cause of treatment failure, and new radiotherapeutic strategies aim at delivering a stronger dose to hypoxic tumor zones to eliminate chordoma tumors [13,42]. In the same intent of improving chordoma patient response to radiotherapy, proton irradiations are used in chordomas in recent clinical trials and show better results than X-rays [43,44]. Even though proton therapy is still poorly accessible, it could be interesting to study the response of our spheroids to this kind of treatment. The chordoma models we established present 3 different levels of radioresistance; hence, such models can be very helpful to evaluate radiosensitizing therapies and to study and compare their effects on low or highly radioresistant cells.

We thus also tested a radiosensitizing approach based on ALDH targeting. Aside from their role in protection against oxidative stress as detoxifying enzymes [15], ALDHs are involved in stem cell maintenance and are the principal marker of cancer stem cells [45]. ALDH1 and ALDH3 are the most extensively studied ALDHs in cancer. Cancer stem cells have increased activity of ALDH1 and ALDH3, and this is particularly used to isolate them from tumor bulk. They are involved in resistance to both chemo- and radiotherapy in most solid tumors [16–18,21,46]. In chordoma, the ALDH activity has been measured in cell lines. These studies demonstrated that a population of U-CH1 cells (between 0.48 and 2.5% depending on the study) have a high ALDH activity [23,24]. In comparison, we found a more important basal rate of ALDH^{high} cells (5% in UT conditions). This can be explained by the fact that we grew the cells in 3D. Indeed, in another study, the JHC7 cell line presented an increase in the ALDH^{high} population when cultured in 3D in comparison to adherent cells cultures [25]. In those studies, the ALDH activity was used to isolate cancer stem cells, and this activity was correlated with increased tumor initiation capacities and with the expression of genes involved in stem cell maintenance. Cancer stem cells have also been detected in chordoma patients and cell lines (JHC7, U-CH1, and U-CH2) [23–25,47]. Here, we confirmed the presence of a subpopulation of cells with a high ALDH activity in 3 different models, but we also correlated this activity with resistance to radiation. This subpopulation of cells could potentially be stem cells.

Finally, we tested the efficacy of an inhibitor of ALDH1/3 (DIMATE). DIMATE has well-known antiproliferative effects in acute myeloid leukemia, non-small cell lung cancer (NSCLC), melanoma, and prostate cancer *in vitro* [26,48–50]. This inhibitor has been used as a monotherapy or combined with a chemotherapeutic agent inducing ROS production in NSCLC, with the aim of disrupting ROS balance in cells to induce death. The combination of DIMATE and CDDP in NSCLC has a synergistic effect on cell death *in vitro* and *in vivo* [26]. Here, we combined DIMATE with radiotherapy (X-rays). An important part of the effects produced by radiotherapy rely on ROS, which enhance DNA damage and lead to cell death. Our results show that the combination of DIMATE and radiation induces a strong inhibition of self-renewal capacities with complete inhibition of both the colony

forming and the sphere forming abilities. Moreover, an important induction of cell death was observed with DIMATE both in mono- and combined therapy. The induction was accelerated in U-CH1 spheroids when the treatments were combined. Such an effect has never been obtained in vitro in chordoma, making ALDH a promising target for future preclinical experiments. Interestingly, the inhibition of RAD51 has been shown to sensitize chordoma cells to radiations in vitro [41]. Moreover, this inhibition also sensitizes cells to aldehyde treatment, substrates of ALDH activity [51]. As our work shows that the inhibition of ALDH activity sensitizes cells to radiations, we wonder whether the inhibition of both RAD51 and ALDH could have synergistic effects and improved response to radiation in chordoma. In conclusion, we created 3D cellular models of sacral chordoma derived from primary, recurrent, and metastatic tumors that reproduce histological and therapeutic features of the disease. These models can be used to decrypt chordoma alterations, in mechanisms of progression, and for preclinical evaluation of drugs. We show for the first time the benefits of using dual inhibitors of ALDH1 and 3 as radiosensitizing agents in chordoma in vitro and provide preclinical support for their use as monotherapies or in combination with radiotherapy in chordoma.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Comparison of RNA sequencing data from spheroids and chordoma patient samples; Figure S2: Graph representative of an aldefluor assay using flow cytometry after treatment with DIMATE; Table S1: Table representing the most up-regulated genes between chordoma spheroids and patient samples in the differentially expressed genes analysis; Table S2: Table representing the most down-regulated genes between chordoma spheroids and patient samples in the differentially expressed genes analysis.

Author Contributions: M-A.L. conducted the experiments, acquired data, analyzed the data, wrote and revised the manuscript. A-L.D., P.B., L.A., I.R., J.B., J.V. acquired data. D.P. and F.T. acquired and analyzed RNA sequencing data. M.K., R.P., O.G. constituted the patient cohort and their clinical information. A.D. and J-Y.B. designed the research study and A.D. wrote the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Centre Leon Berard, ethical approval number 2018-014, approval date 10/03/2018.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available because chordoma cohort is being expanding and more molecular analysis are ongoing and planned.

Acknowledgments: The authors acknowledge Advanced BioDesign (Bron, France) for the DIMATE furniture and the Chordoma Foundation for providing the cell lines.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Das, P.; Soni, P.; Jones, J.; Habboub, G.; Barnholtz-Sloan, J.S.; Recinos, P.F.; Kshetry, V.R. Descriptive Epidemiology of Chordomas in the United States. *J. Neurooncol.* **2020**, *148*, 173–178, doi:10.1007/s11060-020-03511-x.
2. Smoll, N.R.; Gautschi, O.P.; Radovanovic, I.; Schaller, K.; Weber, D.C. Incidence and Relative Survival of Chordomas: The Standardized Mortality Ratio and the Impact of Chordomas on a Population. *Cancer* **2013**, *119*, 2029–2037, doi:10.1002/cncr.28032.
3. Gatta, G.; Capocaccia, R.; Botta, L.; Mallone, S.; Angelis, R.D.; Ardanaz, E.; Comber, H.; Dimitrova, N.; Leinonen, M.K.; Siesling, S.; et al. Burden and Centralised Treatment in Europe of Rare Tumours: Results of RARECAREnet—a Population-Based Study. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 1022–1039, doi:10.1016/S1470-2045(17)30445-X.
4. Radaelli, S.; Fossati, P.; Stacchiotti, S.; Akiyama, T.; Asencio, J.M.; Bandiera, S.; Boglione, A.; Boland, P.; Bolle, S.; Bruland, Ø.; et al. The Sacral Chordoma Margin. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, doi:10.1016/j.ejso.2020.04.028.

5. Uhrenholt, L.; Stimpel, H. Histochemistry of Sacrococcygeal Chordoma. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. A* **1985**, *93A*, 203–204, doi:10.1111/j.1699-0463.1985.tb03941.x.
6. Heery, C.R. Chordoma: The Quest for Better Treatment Options. *Oncol. Ther.* **2016**, *4*, 35–51, doi:10.1007/s40487-016-0016-0.
7. Stacchiotti, S.; Sommer, J.; Chordoma Global Consensus Group Building a Global Consensus Approach to Chordoma: A Position Paper from the Medical and Patient Community. *Lancet Oncol.* **2015**, *16*, e71–e83, doi:10.1016/S1470-2045(14)71190-8.
8. S, S.; A, G.; P, F.; T, A.; C, A.; M, B.; Jy, B.; S, B.; S, B.; P, B.; et al. Best Practices for the Management of Local-Regional Recurrent Chordoma: A Position Paper by the Chordoma Global Consensus Group Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28184416/> (accessed on 20 May 2020).
9. Holliday, E.B.; Mitra, H.S.; Somerson, J.S.; Rhines, L.D.; Mahajan, A.; Brown, P.D.; Grosshans, D.R. Postoperative Proton Therapy for Chordomas and Chondrosarcomas of the Spine: Adjuvant versus Salvage Radiation Therapy. *Spine* **2015**, *40*, 544–549, doi:10.1097/BRS.0000000000000804.
10. Tarpey, P.S.; Behjati, S.; Young, M.D.; Martincorena, I.; Alexandrov, L.B.; Farndon, S.J.; Guzzo, C.; Hardy, C.; Latimer, C.; Butler, A.P.; et al. The Driver Landscape of Sporadic Chordoma. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 890, doi:10.1038/s41467-017-01026-0.
11. Frezza, A.M.; Botta, L.; Trama, A.; Dei Tos, A.P.; Stacchiotti, S. Chordoma: Update on Disease, Epidemiology, Biology and Medical Therapies. *Curr. Opin. Oncol.* **2019**, *31*, 114–120, doi:10.1097/CCO.0000000000000502.
12. Cheney, M.D.; Chen, Y.-L.; Lim, R.; Winrich, B.K.; Grosu, A.L.; Trofimov, A.V.; Depauw, N.; Shih, H.A.; Schwab, J.H.; Hornicek, F.J.; et al. 18F-FMISO PET/CT Visualization of Tumor Hypoxia in Patients with Chordoma of the Mobile and Sacrococcygeal Spine. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2014**, *90*, 1030–1036, doi:10.1016/j.ijrobp.2014.08.016.
13. Chen, Y.L.E.; Faridi, K.; Wang, H.; Lim, R.; Schroeder, H.; Bernstein, K.; Choy, E.; Hornicek, F.J.; DeLaney, T.F. Predictive Value of FMISO Positron Emission Tomography/Computed Tomography Hypoxic Subvolume for Long-Term Disease Recurrence or Metastases in Mobile Spine and Sacrococcygeal Chordoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2016**, *96*, S216–S217, doi:10.1016/j.ijrobp.2016.06.538.
14. Jensen, C.; Teng, Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *7*, 33, doi:10.3389/fmolb.2020.00033.
15. Singh, S.; Brocker, C.; Koppaka, V.; Ying, C.; Jackson, B.; Matsumoto, A.; Thompson, D.C.; Vasiliou, V. Aldehyde Dehydrogenases in Cellular Responses to Oxidative/Electrophilic Stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *56*, 89–101, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.010.
16. Dehghan Harati, M.; Rodemann, H.P.; Toulany, M. Nanog Signaling Mediates Radioresistance in ALDH-Positive Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20051151.
17. Croker, A.K.; Allan, A.L. Inhibition of Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) Activity Reduces Chemotherapy and Radiation Resistance of Stem-like ALDHhiCD44⁺ Human Breast Cancer Cells. *Breast Cancer Res. Treat* **2012**, *133*, 75–87, doi:10.1007/s10549-011-1692-y.
18. Yao, T.; Weng, X.; Yao, Y.; Huang, C.; Li, J.; Peng, Y.; Lin, R.; Lin, Z. ALDH-1-Positive Cells Exhibited a Radioresistant Phenotype That Was Enhanced with Hypoxia in Cervical Cancer. *BMC Cancer* **2020**, *20*, 891, doi:10.1186/s12885-020-07337-8.
19. Cojoc, M.; Peitzsch, C.; Kurth, I.; Trautmann, F.; Kunz-Schughart, L.A.; Teleguev, G.D.; Stakhovskiy, E.A.; Walker, J.R.; Simin, K.; Lyle, S.; et al. Aldehyde Dehydrogenase Is Regulated by β -Catenin/TCF and Promotes Radioresistance in Prostate Cancer Progenitor Cells. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 1482–1494, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1924.
20. Kurth, I.; Hein, L.; Mäbert, K.; Peitzsch, C.; Koi, L.; Cojoc, M.; Kunz-Schughart, L.; Baumann, M.; Dubrovskaya, A. Cancer Stem Cell Related Markers of Radioresistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 34494–34509, doi:10.18632/oncotarget.5417.
21. Awad, O.; Yustein, J.T.; Shah, P.; Gul, N.; Katuri, V.; O’Neill, A.; Kong, Y.; Brown, M.L.; Toretzky, J.A.; Loeb, D.M. High ALDH Activity Identifies Chemotherapy-Resistant Ewing’s Sarcoma Stem Cells That Retain Sensitivity to EWS-FLI1 Inhibition. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13943, doi:10.1371/journal.pone.0013943.
22. Aydemir, E.; Bayrak, O.F.; Sahin, F.; Atalay, B.; Kose, G.T.; Ozen, M.; Seveli, S.; Dalan, A.B.; Yalvac, M.E.; Dogruluk, T.; et al. Characterization of Cancer Stem-like Cells in Chordoma: Laboratory Investigation. *J. Neurosurg.* **2012**, *116*, 810–820, doi:10.3171/2011.12.JNS11430.
23. Tuysuz, E.C.; Gulluoglu, S.; Yaltirik, C.K.; Ozbey, U.; Kuskucu, A.; Çoban, E.A.; Sahin, F.; Türe, U.; Bayrak, O.F. Distinctive Role of Dysregulated miRNAs in Chordoma Cancer Stem-like Cell Maintenance. *Exp. Cell Res.* **2019**, *380*, 9–19, doi:10.1016/j.yexcr.2019.03.039.
24. Owen, J.H.; Komarck, C.M.; Wang, A.C.; Abuzeid, W.M.; Keep, R.F.; McKean, E.L.; Sullivan, S.; Fan, X.; Prince, M.E.P. UM-Chor1: Establishment and Characterization of the First Validated Clival Chordoma Cell Line. *J. Neurosurg.* **2017**, *128*, 701–709, doi:10.3171/2016.10.JNS16877.
25. Shah, S.R.; David, J.M.; Tippens, N.D.; Mohyeldin, A.; Martinez-Gutierrez, J.C.; Ganaha, S.; Schiapparelli, P.; Hamilton, D.H.; Palena, C.; Levchenko, A.; et al. Brachyury-YAP Regulatory Axis Drives Stemness and Growth in Cancer. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 495–507, doi:10.1016/j.celrep.2017.09.057.
26. Rebolledo-Rios, R.; Venton, G.; Sánchez-Redondo, S.; Felip, C.I.; Fournet, G.; González, E.; Fernández, W.R.; Escuela, D.O.B.; Stefano, B.D.; Penarroche-Díaz, R.; et al. Dual Disruption of Aldehyde Dehydrogenases 1 and 3 Promotes Functional Changes in the Glutathione Redox System and Enhances Chemosensitivity in Non-small Cell Lung Cancer. *Oncogene* **2020**, *39*, 2756–2771, doi:10.1038/s41388-020-1184-9.

27. Dinavahi, S.S.; Gowda, R.; Bazewicz, C.G.; Battu, M.B.; Lin, J.M.; Chitren, R.J.; Pandey, M.K.; Amin, S.; Robertson, G.P.; Gowda, K. Design, Synthesis Characterization and Biological Evaluation of Novel Multi-Isoform ALDH Inhibitors as Potential Anticancer Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *187*, 111962, doi:10.1016/j.ejmech.2019.111962.
28. Koppaka, V.; Thompson, D.C.; Chen, Y.; Ellermann, M.; Nicolaou, K.C.; Juvonen, R.O.; Petersen, D.; Deitrich, R.A.; Hurley, T.D.; Vasiliou, V. Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: A Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64*, 520–539, doi:10.1124/pr.111.005538.
29. Maaten, L. van der; Hinton, G. Visualizing Data Using T-SNE. *J. Mach. Learn. Res.* **2008**, *9*, 2579–2605.
30. Moreno, L.; Pearson, A.D.J. How Can Attrition Rates Be Reduced in Cancer Drug Discovery? *Expert. Opin. Drug Discov.* **2013**, *8*, 363–368, doi:10.1517/17460441.2013.768984.
31. Roselli, M.; Fernando, R.I.; Guadagni, F.; Spila, A.; Alessandrini, J.; Palmirotta, R.; Costarelli, L.; Litzinger, M.; Hamilton, D.; Huang, B.; et al. Brachyury, a Driver of the Epithelial-Mesenchymal Transition, Is Overexpressed in Human Lung Tumors: An Opportunity for Novel Interventions against Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 3868–3879, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-3211.
32. Wan, Z.; Jiang, D.; Chen, S.; Jiao, J.; Ji, L.; Shah, A.S.; Wei, H.; Yang, X.; Li, X.; Wang, Y.; et al. T-Box Transcription Factor Brachyury Promotes Tumor Cell Invasion and Metastasis in Non-Small Cell Lung Cancer via Upregulation of Matrix Metalloproteinase 12. *Oncol. Rep.* **2016**, *36*, 306–314, doi:10.3892/or.2016.4792.
33. Chen, M.; Zou, S.; He, C.; Zhou, J.; Li, S.; Shen, M.; Cheng, R.; Wang, D.; Zou, T.; Yan, X.; et al. Transactivation of SOX5 by Brachyury Promotes Breast Cancer Bone Metastasis. *Carcinogenesis* **2020**, *41*, 551–560, doi:10.1093/carcin/bgz142.
34. Du, R.; Wu, S.; Lv, X.; Fang, H.; Wu, S.; Kang, J. Overexpression of Brachyury Contributes to Tumor Metastasis by Inducing Epithelial-Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2014**, *33*, 105, doi:10.1186/s13046-014-0105-6.
35. Otani, R.; Mukasa, A.; Shin, M.; Omata, M.; Takayanagi, S.; Tanaka, S.; Ueki, K.; Saito, N. Brachyury Gene Copy Number Gain and Activation of the PI3K/Akt Pathway: Association with Upregulation of Oncogenic Brachyury Expression in Skull Base Chordoma. *J. Neurosurg.* **2018**, *128*, 1428–1437, doi:10.3171/2016.12.JNS161444.
36. Fang, Y.; Eglén, R.M. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov.* **2017**, *22*, 456–472, doi:10.1177/1087057117696795.
37. Langhans, S.A. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol.* **2018**, *9*, 6, doi:10.3389/fphar.2018.00006.
38. Garreta, E.; Kamm, R.D.; Chuva de Sousa Lopes, S.M.; Lancaster, M.A.; Weiss, R.; Trepát, X.; Hyun, I.; Montserrat, N. Rethinking Organoid Technology through Bioengineering. *Nat. Mater* **2020**, doi:10.1038/s41563-020-00804-4.
39. Scognamiglio, G.; De Chiara, A.; Parafioriti, A.; Armiraglio, E.; Fazioli, F.; Gallo, M.; Aversa, L.; Camerlingo, R.; Cacciatore, F.; Colella, G.; et al. Patient-Derived Organoids as a Potential Model to Predict Response to PD-1/PD-L1 Checkpoint Inhibitors. *Br. J. Cancer.* **2019**, *121*, 979–982, doi:10.1038/s41416-019-0616-1.
40. Kato, T.A.; Tsuda, A.; Uesaka, M.; Fujimori, A.; Kamada, T.; Tsujii, H.; Okayasu, R. In Vitro Characterization of Cells Derived from Chordoma Cell Line U-CH1 Following Treatment with X-Rays, Heavy Ions and Chemotherapeutic Drugs. *Radiat. Oncol.* **2011**, *6*, 116, doi:10.1186/1748-717X-6-116.
41. Zhang, C.; Wang, B.; Li, L.; Li, Y.; Li, P.; Lv, G. Radioresistance of Chordoma Cells Is Associated with the ATM/ATR Pathway, in Which RAD51 Serves as an Important Downstream Effector. *Exp. Ther. Med.* **2017**, *14*, 2171–2179, doi:10.3892/etm.2017.4736.
42. Yan, S.; Broussard, G.; De, K.; Bernstein, A.; Wang, Y. SU-F-T-203: High Dose Definitive Proton Therapy with Integrated Boost to Hypoxic Subvolumes Determined by [18F]-Fluoromisonidazole (FMISO) PET/CT for Patients with Recurrent Chordomas Using Intensity Modulated Proton Therapy (IMPT). *Med. Phys.* **2016**, *43*, 3508–3509, doi:10.1118/1.4956340.
43. Aibe, N.; Demizu, Y.; Sulaiman, N.S.; Matsuo, Y.; Mima, M.; Nagano, F.; Terashima, K.; Tokumaru, S.; Hayakawa, T.; Suga, M.; et al. Outcomes of Patients With Primary Sacral Chordoma Treated With Definitive Proton Beam Therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2018**, *100*, 972–979, doi:10.1016/j.ijrobp.2017.12.263.
44. Baumann, B.C.; Lustig, R.A.; Mazzoni, S.; Grady, S.M.; O'Malley, B.W.; Lee, J.Y.K.; Newman, J.G.; Schuster, J.M.; Both, S.; Lin, A.; et al. A Prospective Clinical Trial of Proton Therapy for Chordoma and Chondrosarcoma: Feasibility Assessment. *J. Surg. Oncol.* **2019**, *120*, 200–205, doi:10.1002/jso.25502.
45. Clark, D.W.; Palle, K. Aldehyde Dehydrogenases in Cancer Stem Cells: Potential as Therapeutic Targets. *Ann. Transl. Med.* **2016**, *4*, doi:10.21037/atm.2016.11.82.
46. Bidan, N.; Bailleul-Dubois, J.; Duval, J.; Winter, M.; Denoulet, M.; Hannebicque, K.; El-Sayed, I.Y.; Ginestier, C.; Forissier, V.; Charafe-Jauffret, E.; et al. Transcriptomic Analysis of Breast Cancer Stem Cells and Development of a PALDH1A1:MNepTune Reporter System for Live Tracking. *Proteomics* **2019**, *19*, e1800454, doi:10.1002/pmic.201800454.
47. Fujii, R.; Friedman, E.R.; Richards, J.; Tsang, K.Y.; Heery, C.R.; Schlom, J.; Hodge, J.W. Enhanced Killing of Chordoma Cells by Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity Employing the Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab. *Oncotarget* **2016**, *7*, 33498–33511, doi:10.18632/oncotarget.9256.
48. Venton, G.; Pérez-Alea, M.; Baier, C.; Fournet, G.; Quash, G.; Labiad, Y.; Martin, G.; Sanderson, F.; Poullin, P.; Suchon, P.; et al. Aldehyde Dehydrogenases Inhibition Eradicates Leukemia Stem Cells While Sparing Normal Progenitors. *Blood Cancer J* **2016**, *6*, e469, doi:10.1038/bcj.2016.78.
49. Quash, G.; Fournet, G.; Courvoisier, C.; Martinez, R.M.; Chantepie, J.; Paret, M.J.; Pharoaz, J.; Joly-Pharoaz, M.O.; Goré, J.; André, J.; et al. Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: α,β -Acetylenic N-Substituted Aminothioesters Are Reversible Growth

- Inhibitors of Normal Epithelial but Irreversible Apoptogens for Cancer Epithelial Cells from Human Prostate in Culture. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 906–916, doi:10.1016/j.ejmech.2007.06.004.
50. Pérez-Alea, M.; McGrail, K.; Sánchez-Redondo, S.; Ferrer, B.; Fournet, G.; Cortés, J.; Muñoz, E.; Hernandez-Losa, J.; Tenbaum, S.; Martin, G.; et al. ALDH1A3 Is Epigenetically Regulated during Melanocyte Transformation and Is a Target for Melanoma Treatment. *Oncogene* **2017**, *36*, 5695–5708, doi:10.1038/onc.2017.160.
51. Tacconi, E.M.; Lai, X.; Folio, C.; Porru, M.; Zonderland, G.; Badie, S.; Michl, J.; Sechi, I.; Rogier, M.; Matía García, V.; et al. BRCA1 and BRCA2 Tumor Suppressors Protect against Endogenous Acetaldehyde Toxicity. *EMBO Mol. Med.* **2017**, *9*, 1398–1414, doi:10.15252/emmm.201607446.

Discussions et perspectives

La rareté des chordomes a retardé le développement de thérapies prenant en compte les spécificités de ces tumeurs. En effet, les connaissances moléculaires des altérations du chordome sont partielles où l'on connaît moins les voies de signalisation altérées que dans les autres sarcomes³³⁰. Il est nécessaire de mieux comprendre et de décrypter les mécanismes moléculaires intrinsèques du chordome pour pallier à ce manque de thérapies efficaces. Les avancées dans le domaine du séquençage et de la culture cellulaire permettent aujourd'hui de mieux connaître et de mieux modéliser les tumeurs. En effet, les techniques de séquençage de l'ARN total, du génome entier, de l'épigénome des tumeurs permettent de mieux comprendre les facteurs influençant l'origine, la progression et la résistance aux traitements des tumeurs.

L'émergence des nouvelles techniques de culture en trois dimensions à partir de lignées cellulaires (sphéroïdes) ou à partir de tumeurs de patients (organoïdes) a permis d'améliorer de façon considérable les modèles cellulaires d'étude des cancers. Ces modèles récapitulent notamment les interactions cellule-cellule, cellule-matrice, reproduisent le gradient d'oxygène et d'accès aux nutriments présents au sein des tumeurs solides. Ils aident à mieux prédire la réponse aux thérapies. Dans le chordome, très peu d'études génomiques, transcriptomiques, ou épigénomiques ont été réalisées. Les seules disponibles sont souvent effectuées sur de petites cohortes avec très peu de données cliniques associées. Sur le plan de modélisation, un grand retard est aussi constaté par rapport aux autres tumeurs solides où des modèles perfectionnés tels que les organoïdes sont maintenant bien développés. Face à ces problématiques, nous avons défini les objectifs de ma thèse comme suit : i) constituer une cohorte de chordomes avec leurs renseignements cliniques afin de définir le profil transcriptomique du chordome et mieux connaître les spécificités de cette tumeur ; ii) établir et caractériser des modèles de culture cellulaires 3D récapitulant les principales caractéristiques du chordome, qui soient faciles à générer et reproductibles ; iii) évaluer une approche thérapeutique innovante dans les modèles 3D établis dans l'objectif ii). Ce dernier point

permet de valider l'utilisation de ce modèle et établit une preuve de concept de thérapie radiosensibilisante dans le chordome. Dans cette partie nous allons discuter des résultats obtenus et des perspectives à venir.

I. Signature transcriptomique des voies de signalisation du chordome :

Nous avons effectué le profil transcriptomique d'une cohorte homogène étudiée constituée de 12 cas de chordomes sacrés conventionnels, dont 11 cas de tumeurs primaires et une métastase. Cette cohorte nécessite d'être agrandie pour pouvoir faire de plus amples analyses.

Le calcul des scores d'expression des fonctions biologiques les plus souvent altérées dans les cancers a été effectué pour chaque patient³³¹. Des scores élevés sont détectés pour les voies de l'hypoxie et la phosphorylation oxydative alors que des scores faibles sont observés pour les voies de l'inflammation et du cycle cellulaire. Ces résultats sont en accord avec les caractéristiques cliniques du chordome ; à savoir une tumeur à croissance lente, peu vascularisée, ce qui entraîne une forte hypoxie et une faible infiltration immunitaire^{30,332,333}. Plusieurs analyses transcriptomiques du chordome ont déjà été effectuées. Une première étude transcriptomique a permis de détecter une surexpression des gènes impliqués dans la matrice extracellulaire (aggrécan, matriline, etc) et de montrer l'expression des gènes codant pour Brachyury, CD24 et les kératines⁷⁸. Dans nos analyses, nous nous sommes concentrées sur d'autres processus biologiques, mais l'étude de la déposition et de la dégradation de la matrice extracellulaire au niveau transcriptomique pourrait être intéressante dans le futur.

Deux autres études ont montré une surexpression de gènes impliqués dans le développement et la différenciation et une sous expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire^{79,80}. Nos travaux confirment les données de cette dernière étude en démontrant une voie de l'inflammation très faiblement exprimée. Concernant l'environnement immunitaire, nos analyses ont permis d'aller plus loin en analysant l'infiltrat immunitaire au

niveau transcriptomique. En effet, les résultats montrent que les chordomes présentent en général très peu d'infiltrat immunitaire. Comme dans les autres sarcomes osseux, une prévalence des cellules de l'immunité innée, notamment des macrophages a été retrouvée. Ces données sont confirmées par différentes études visant à étudier l'infiltrat immunitaire des chordomes qui relèvent un immunoscore généralement faibles³³³. La présence de cellules immunitaires a été reliée au pronostic des patients en termes de survie et de progression. Il serait donc intéressant de poursuivre la caractérisation de cet environnement immunitaire des chordomes afin de définir des cibles d'immunothérapies.

La comparaison du répertoire transcriptomique total des chordomes et sarcomes a permis de montrer que les chordomes forment un cluster homogène très éloigné des autres sarcomes. Deux études transcriptomiques ont comparé les chordomes à d'autres sarcomes mais elles utilisaient des puces à ARN, technique moins précise que le séquençage complet des ARN que nous avons effectué^{78,334}. De plus, ces deux études ont utilisé une autre technique pour visualiser la distance entre les répertoires d'expression génique des chordomes et des autres sarcomes³²⁹. Cela conduit à des résultats assez différents puisque leur méthode ne permet pas de dissocier les sous-types moléculaires de sarcomes, qui semblent avoir un répertoire transcriptomique proche³³⁵. La visualisation UMAP que nous avons utilisée permet de voir que les sarcomes des tissus mous ont des répertoires transcriptomiques proches, alors que les sarcomes osseux sont plus éloignés, et enfin très éloigné le cluster de chordomes. Cela peut être expliqué par le fait notamment que les tumeurs osseuses contiennent de la matrice extracellulaire ostéoïde ou chondroïde^{336,337} et des cellules de type ostéoblastique, chondroblastique qui ont un répertoire transcriptomique bien distinct des autres types cellulaires³³⁸. De la même façon, le chordome possède des cellules très spécifiques ayant un phénotype physalypore et une matrice extracellulaire particulière qui ont toutes deux une signature particulière³³⁹.

Les larges différences de répertoire transcriptomique des chordomes par rapport aux autres sarcomes peuvent être dûes à leurs origines différentes. En effet, les sarcomes proviennent des cellules souches mésenchymateuses³⁴⁰. Le chordome proviendrait lui de la transformation de vestiges de cellules notochordales non dégénérées pendant l'embryogenèse^{14,163}. Cette question de l'origine peut aussi expliquer l'éloignement dans leur répertoire transcriptomique.

Pour aller plus loin dans la comparaison entre les chordomes et les autres sarcomes, nous avons comparé le score obtenu pour chaque fonction biologique des chordomes, à celui des sarcomes. Nous avons alors observé des scores très extrêmes pour le chordome, reflétant bien l'éloignement trouvé précédemment dans la visualisation UMAP. De façon intéressante, les voies de l'hypoxie et de la glycolyse ont des scores très élevés chez tous les patients chordome en comparaison avec les autres sarcomes. Cela peut être expliqué par le fait qu'un mécanisme d'adaptation à l'hypoxie commun aux cellules cancéreuses est le passage au métabolisme glycolytique pour produire de l'énergie sans oxygène³⁴¹. Que ce soit dans les sarcomes osseux ou des tissus mous, une forte hypoxie et un métabolisme glycolytique augmentés sont corrélés à un moins bon pronostic chez les patients^{240,242,342}. Ainsi, les chordomes utilisent les mêmes mécanismes d'adaptation au manque d'oxygène que les autres sarcomes, mais semblent utiliser le métabolisme glycolytique plus fortement. L'inhibition du métabolisme glycolytique dans des lignées de sarcomes des tissus mous³⁴³ et sarcomes osseux^{344,344} induit une diminution de la prolifération et une induction de la mort cellulaire. Il serait donc intéressant d'évaluer ce genre de stratégie dans le chordome. Pour cela, l'établissement de modèles d'études récapitulant les conditions hypoxiques du chordome est nécessaire.

Ayant les données transcriptomiques d'une cohorte de sarcomes importante, il serait désormais intéressant de compléter notre cohorte avec

de nouveaux cas afin de pouvoir étudier et comparer les acteurs impliqués dans la progression des chordomes et sarcomes.

II. Caractérisation histologique, morphologique, et transcriptomique des modèles de chordome :

L'étude du chordome est rendue difficile par le manque de modèles représentatifs de ses caractéristiques particulières. Ces modèles permettraient à la fois d'étudier les mécanismes de résistance aux traitements de ces tumeurs, et de prédire la réponse à de nouvelles thérapies.

En effet, il existe aujourd'hui 14 lignées cellulaires de chordome établies à partir d'échantillons de patients. Néanmoins, ces lignées sont cultivées en deux dimensions et ne présentent donc pas de matrice extracellulaire ni de zones hypoxiques, deux caractéristiques retrouvées dans la pathologie humaine. De plus, l'accès au milieu de culture et donc aux drogues est identique pour toutes les cellules en culture en deux dimensions. Dans ces conditions de culture, les cellules sont sensibles à des doses plus faibles et sont donc de moins bons prédicteurs de réponse thérapeutique. Des modèles animaux de chordome ont été développés récemment, il s'agit de modèles PDX. Ces modèles présentent des limitations, notamment une technique de greffe orthotopique difficile et un temps de prise de greffe très long (2 à 3 mois en moyenne). Ce genre de modèles ne peut pas être utilisé pour des tests de drogues multiples.

Ces dernières années ont vu l'émergence de techniques de culture 3D, applicables même dans les tumeurs rares telles que les sarcomes osseux. Par exemple, des modèles de culture 3D à partir de lignées cellulaires de chondrosarcome ont été mis au point et ont permis d'améliorer l'étude de leur réponse aux radiations³⁴⁵. Pour le chordome, jusqu'à présent, seuls quelques essais de mise en culture 3D sont rapportés. Par exemple, la lignée cellulaire U-CH1 a été cultivée en 3D et son expression de la cytokératine et de la vimentine a été mesurée dans ce système, démontrant

la possibilité de cultiver ces cellules en 3D⁹⁹. Des travaux ont aussi permis de développer des organoïdes de chordome, c'est-à-dire à partir de cellules issues de tumeurs de patients directement au moment de l'exérèse. Ces modèles ont servi à l'évaluation de l'efficacité d'un anti PD1 mais n'ont pas été caractérisés¹⁴². La caractérisation de ce type de modèles nécessite la validation que l'organoïde est représentatif de la tumeur d'origine en termes de types cellulaires rencontrés, de profil génomiques et transcriptomiques et que ces similarités perdurent de passages en passages.

Face à ce besoin de modèles valides de chordome, nous avons établi et caractérisé exhaustivement des modèles de culture 3D de chordome. Ces modèles cellulaires 3D de chordome ont été établis à partir de 3 lignées cellulaires représentant trois stades de la maladie. Des modèles cellulaires à partir de tumeurs primaires et métastases provenant du même patient ont déjà été établis. Cela permet d'éviter un biais lié à l'hétérogénéité inter patients¹⁰⁴. Cependant, ces travaux sont effectués en 2D, ce qui est moins représentatif de la maladie.

Nos modèles gardent des caractéristiques histologiques identiques aux tumeurs d'origine. Tout comme dans le dernier modèle de PDX orthotopique de chordome créé chez la souris, nos modèles expriment les marqueurs de diagnostic Brachyury, CD24, EMA et les cytokératines. Ainsi, les sphéroïdes de chordome sont représentatifs de l'histologie de cette tumeur aussi bien qu'un modèle animal¹²⁵. Une expression plus forte de Brachyury est retrouvée dans les sphéroïdes issus de la métastase par rapport aux sphéroïdes issus de la tumeur primaire. Cela peut être dû au fait que Brachyury est une protéine driver de la transition épithélio-mésenchymateuse dont l'expression est corrélée avec la dissémination métastatique dans de nombreuses tumeurs solides.

Les sphéroïdes de chordome établis possèdent un répertoire transcriptomique similaire à ceux des échantillons de patients. Une analyse transcriptomique de la lignée U-CH1 et de 8 patients montrent leur clusterisation. Cependant ces travaux ont été réalisés sur quelques gènes

quand nos travaux étudient le répertoire transcriptomique complet des sphéroïdes et des échantillons de patients⁹⁸.

Si les sphéroïdes établis semblent représentatifs du chordome, il serait bon de compléter cette étude par une comparaison des analyses transcriptomiques des mêmes lignées cultivées en 2D. Cela permettrait de vérifier qu'une différence d'expression est bien observée dans les gènes de la MEC par exemple.

III. Les sphéroïdes sont représentatifs de la croissance, l'hypoxie, la production de MEC et la radiorésistance du chordome

Si les sphéroïdes sont similaires aux tumeurs en termes d'histologie, de morphologie et d'expression génique, nous avons aussi validé qu'ils étaient représentatifs de la croissance lente, la forte hypoxie et la production de matrice extracellulaire du chordome.

Nous avons démontré que les sphéroïdes suivent l'évolution de la maladie avec les sphéroïdes issus de la tumeur primaire ayant la croissance la plus lente et les sphéroïdes issus de la métastase, la plus rapide.

Les sphéroïdes produisent une MEC de type mucoïde similaire à celle retrouvée dans le dernier modèle de PDX orthotopique établi à partir de tumeurs de patients¹²⁵. Cette sécrétion de MEC semble provenir des cellules tumorales elles-mêmes, et non des cellules stromales comme dans la plupart des tumeurs³⁴⁶. Une comparaison de la composition de la MEC des sphéroïdes à celle des tumeurs de patients confirmerait cette hypothèse.

Enfin, le chordome est caractérisé par la présence de zones hypoxiques^{108,347}. Les sphéroïdes présentent également des zones hypoxiques. Jusqu'à présent, une seule étude a étudié l'impact de l'hypoxie sur des lignées cellulaires de chordome cultivées en 2D. Cette étude a montré que les cellules sont capables de proliférer même en conditions hypoxiques⁹⁹. Nos résultats montrent que les cellules de chordome sont aussi capables de proliférer en conditions hypoxiques dans le chordome. Nos modèles ont un

degré de complexité supplémentaire puisqu'ils sont représentatifs d'un gradient d'oxygène.

L'hypoxie étant un facteur central dans la radiorésistance, nos modèles sont appropriés à l'étude de la radiorésistance dans les chordomes.

Les chordomes présentent une forte radiorésistance, dont les mécanismes sont encore peu connus. Nos résultats démontrent 3 niveaux de radiorésistance différents avec les sphéroïdes U-CH12 les plus radiorésistants et les sphéroïdes CH22 les plus radiosensibles. La forte radiorésistance trouvée pour les sphéroïdes U-CH1 similaire à une première étude où un niveau de radiorésistance élevé a été retrouvé²⁸². Une autre étude a cependant rapporté une radiosensibilité normale pour la lignée U-CH1³⁴⁸. Néanmoins, les auteurs ont modifié au préalable la lignée pour ne garder qu'un clone se divisant très vite. Or, plusieurs études ont corrélé la vitesse de croissance d'une tumeur à sa radiosensibilité. Des études de lignées cellulaires radiorésistantes dans le rhabdomyosarcome²²⁸ et le cancer du sein³⁴⁹ ont démontré une prolifération plus élevée chez les lignées radiosensibles. Ainsi, ce taux de prolifération différent entre leur clone U-CH1 et la lignée U-CH1 que nous avons utilisé peut expliquer les divergences de résultats obtenus. La même explication peut s'appliquer à la plus grande radiosensibilité des sphéroïdes CH22, les sphéroïdes CH22 proliférant beaucoup plus rapidement sont donc plus sensibles à la radiothérapie. La plus forte radiosensibilité de CH22 peut aussi être due au fait qu'ils ne produisent pas de MEC. En effet, dans des modèles cellulaires 3D de sarcome, une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire et la matrice extracellulaire est observée. L'expression de ces gènes est corrélée à une plus forte radiorésistance de ces modèles en 3D¹¹⁵.

La radiothérapie conventionnelle est le plus souvent utilisée pour les chordomes. Cependant, des études cliniques récentes ont reporté une meilleure efficacité des protons thérapies. Il serait donc intéressant de

finaliser la caractérisation des sphéroïdes en mesurant leur sensibilité à la proton thérapie.

Dans le même objectif d'améliorer la radiosensibilité des chordomes, cibler mécanismes de détoxification de la cellule pourrait être une stratégie intéressante. Nous avons choisi d'évaluer le potentiel radiosensibilisant de l'inhibition de l'activité ALDH dans les sphéroïdes de chordome.

IV. Activités ALDH dans les chordomes et radiosensibilisation :

Les aldéhydes déshydrogénases représentent une famille d'enzymes impliquées dans la gestion du stress oxydatif et dans le phénotype des cellules souches via la détoxification des aldéhydes. Nos travaux sont les premiers à démontrer l'expression des ALDH au niveau transcriptomique dans les chordomes. Ils montrent que les ALDH1, 3 et 18, isoformes les plus impliqués dans la progression tumorale, sont les plus exprimées dans les chordomes³¹⁴. Elles paraissent donc une cible potentielle intéressante dans les chordome. Ces cibles sont d'autant plus intéressantes que quelques études ont souligné la présence d'une sous-population de cellules à activité ALDH élevée au sein de lignées cellulaires de chordome. Dans la lignée U-CH1 notamment, une sous-population de cellules (représentant 0,48% à 2,5% des cellules totales selon les études) à forte activité ALDH est présente^{121,289}. En comparaison, nous avons trouvé une proportion plus importante de cette population au niveau basal (5% environ). Cette différence peut venir du fait que les études ont été réalisées sur des cultures de cellules adhérentes (2D) alors que la nôtre est en 3D. Cette hypothèse est soutenue par les résultats obtenus pour la lignée JHC7 qui présente une proportion de cellules à activité ALDH augmentée lorsqu'elle est cultivée en 3D par rapport à la 2D²⁸⁷. Il est à noter que dans ces études, l'activité ALDH est utilisée pour isoler les cellules à caractère souche. Une activité ALDH élevée est alors corrélée à une augmentation des capacités d'initiation de la tumeur et à l'expression de marqueurs de maintenance des cellules

souches. Cela a permis de mettre en évidence des cellules souches dans les lignées cellulaires JHC7, UMChor1, U-CH1 et U-CH2^{121,286-289}. Nos travaux ont confirmé la présence de cellules à activité ALDH élevée dans les lignées U-CH1, U-CH12 et CH22 cultivées en 3D. Sur la base de ces données et de plusieurs études démontrant la corrélation entre activité ALDH élevée et cellules souches cancéreuses, il serait bon d'explorer plus en détail le profil des cellules ALDH+ dans les sphéroïdes.

L'expression des ALDH dans la cohorte et dans les sphéroïdes a permis de démontrer qu'il s'agissait d'une cible thérapeutique potentielle. Nous avons donc évalué l'efficacité thérapeutique de la combinaison radiothérapie et inhibition des ALDH1 et 3 dans les sphéroïdes.

Les radiations entraînent la production de ROS qui vont activer le système anti oxydant, dont l'activité aldéhyde déshydrogénase. L'inhibition des ALDH couplée à de la radiothérapie pourrait restaurer la radiosensibilité des chordomes. Plusieurs inhibiteurs multi-isoformes d'ALDH sont disponibles sur le marché mais présentent des caractéristiques différentes : un ciblage aspécifique³⁵⁰ ou une trop forte toxicité³⁵¹. Le DIMATE, un inhibiteur compétitif des ALDH1 et 3 développé par la société Advanced BioDesign, a démontré des effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques à la fois *in vitro* et *in vivo* dans les cancers de la prostate³⁵², du poumon³⁵³ ainsi que dans le mélanome³⁵⁴ et la leucémie³²⁷. Nos travaux démontrent que cet inhibiteur a des effets anti-prolifératifs et induit la mort cellulaire des sphéroïdes de chordome *in vitro*. La combinaison du DIMATE et de la radiothérapie induit un arrêt de la prolifération, une inhibition des capacités d'autorenouveaulement ainsi que la mort cellulaire des sphéroïdes de chordome. Le DIMATE a donc un effet radiosensibilisant sur les sphéroïdes de chordome *in vitro*.

D'autres stratégies de radiosensibilisation ont été évaluées dans des tests précliniques dans le chordome tels que l'inhibition par shRNA de la protéine RAD51, impliquée dans la réparation à l'ADN. En effet, l'utilisation de shRNA-RAD51 entraîne une augmentation de la radiosensibilité, des lignée

UCH1 et UCH2 cultivée en 2 dimensions²⁸². Cet effet est, d'une part, moins important que celui obtenu avec le DIMATE en 3D aux mêmes doses, et a une application clinique limitée étant donné qu'il s'agit d'un shRNA. Une autre approche a été évaluée, l'inhibition de la traduction de la protéine PP2A, impliquée dans le cycle cellulaire, avec l'utilisation de l'inhibiteur LB100. L'inhibition de PP2A entraîne une augmentation de la sensibilité à la radiothérapie de cellules cultivées en 2 dimensions et retarde la croissance tumorale *in vivo*³⁵⁵. Cet inhibiteur a fait l'objet d'une étude clinique de phase 1 afin de vérifier sa toxicité, et confirme l'idée qu'une stratégie radiosensibilisante est applicable dans le cadre du chordome. Néanmoins, cibler le cycle cellulaire induit un effet sur toutes les cellules qu'elles soient normales ou cancéreuses. Le DIMATE a démontré pour l'instant aucun effet sur les cellules normales lorsqu'il a été testé sur les pneumocytes et les cellules sanguines.

Nous avons donc démontré l'efficacité d'une stratégie radiosensibilisante dans le chordome. La génération de ces modèles et les tests de cible ouvrent plusieurs perspectives. Mais il reste à valider la spécificité de l'effet du DIMATE sur les ALDH1 et 3. Pour ce faire, des inhibitions non pharmacologiques à l'aide d'outils CRISPR/Cas9 des ALDH1 et 3 doivent être réalisés. Cela nous permettra à la fois de valider la spécificité de l'effet et de déterminer quel isoforme est responsable du mécanisme du DIMATE. Un autre élément à confirmer est l'efficacité du DIMATE *in vivo*. Pour cela, un modèle PDX orthotopique de chordome établi récemment serait un bon modèle¹²⁵. Enfin, nous pourrions étudier le mécanisme par lequel le DIMATE induit un effet en mesurant son effet sur la balance oxydative des cellules et sur le phénotype souche des cellules de chordome.

Ces travaux ont permis de définir le profil transcriptomique des chordomes en comparaison aux sarcomes. De plus, ces travaux ont permis de créer des modèles cellulaires 3D de chordome qui reproduisent les caractéristiques histologiques, morphologiques et le répertoire transcriptomique de la maladie. Ces modèles peuvent désormais être utilisés pour décrypter les altérations et les mécanismes de progression et de résistance aux thérapies du chordome, ainsi que pour l'évaluation de l'efficacité de drogues. Nous avons démontré pour la première fois, le bénéfice de l'utilisation d'un inhibiteur des ALDH1 et 3 en tant qu'agent radiosensibilisant dans le chordome et nous avons fourni un support pré-clinique à son utilisation en tant que monothérapie ou en combinaison avec de la radiothérapie dans le chordome.

Bibliographie

1. Horwitz, T. *The human notochord: a study of its development and regression, variations, and pathologic derivative, chordoma*. (Horwitz, 1977).
2. Stemple, D. L. Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. *Development* **132**, 2503–2512 (2005).
3. Corallo, D., Trapani, V. & Bonaldo, P. The notochord: structure and functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 2989–3008 (2015).
4. Lawson, L. & Harfe, B. D. Notochord to Nucleus Pulposus Transition. *Curr Osteoporos Rep* **13**, 336–341 (2015).
5. Horten, B. C. & Montague, S. R. In vitro characteristics of a sacrococcygeal chordoma maintained in tissue and organ culture systems. *Acta Neuropathol* **35**, 13–25 (1976).
6. Yamaguchi, T., Suzuki, S., Ishiiwa, H. & Ueda, Y. Intraosseous benign notochordal cell tumours: overlooked precursors of classic chordomas? *Histopathology* **44**, 597–602 (2004).
7. Kyriakos, M. Benign notochordal lesions of the axial skeleton: a review and current appraisal. *Skeletal Radiol* **40**, 1141–1152 (2011).
8. Iorgulescu, J. B. *et al.* Benign Notochordal Cell Tumors of the Spine Natural History of 8 Patients With Histologically Confirmed Lesions. *Neurosurgery* **73**, 411–416 (2013).
9. Salisbury, J. R., Deverell, M. H., Cookson, M. J. & Whimster, W. F. Three-dimensional reconstruction of human embryonic notochords: clue to the pathogenesis of chordoma. *J Pathol* **171**, 59–62 (1993).
10. Salisbury, J. R. The pathology of the human notochord. *J Pathol* **171**, 253–255 (1993).
11. Shen, J. *et al.* Classic chordoma coexisting with benign notochordal cell rest demonstrating different immunohistological expression patterns of brachyury and galectin-3. *J Clin Neurosci* **18**, 96–99 (2011).
12. Vujovic, S. *et al.* Brachyury, a crucial regulator of notochordal development, is a novel biomarker for chordomas. *J. Pathol.* **209**, 157–165 (2006).
13. Deshpande, V., Nielsen, G. P., Rosenthal, D. I. & Rosenberg, A. E. Intraosseous benign notochord cell tumors (BNCT): further evidence supporting a relationship to chordoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **31**, 1573–1577 (2007).
14. Shen, J. *et al.* Histological Study of Chordoma Origin From Fetal Notochordal Cell Rests. *Spine* **38**, 2165–2170 (2013).
15. Yamaguchi, T., Suzuki, S., Ishiiwa, H., Shimizu, K. & Ueda, Y. Benign Notochordal Cell Tumors: A Comparative Histological Study of Benign Notochordal Cell Tumors, Classic Chordomas, and Notochordal Vestiges of Fetal Intervertebral Discs. *The American Journal of Surgical Pathology* **28**, 756–761 (2004).
16. Tirabosco, R. *et al.* Brachyury Expression in Extra-axial Skeletal and Soft Tissue Chordomas: A Marker that Distinguishes Chordoma From Mixed Tumor/Myoepithelioma/Parachordoma in Soft Tissue. *The American Journal of Surgical Pathology* **32**, 572–580 (2008).
17. Sundaresan, N. Chordomas. *Clin Orthop Relat Res* 135–142 (1986).
18. Benndorf, M., Neubauer, J., Langer, M. & Kotter, E. Bayesian pretest

- probability estimation for primary malignant bone tumors based on the Surveillance, Epidemiology and End Results Program (SEER) database. *Int J Comput Assist Radiol Surg* **12**, 485–491 (2017).
19. Mukherjee, D., Chaichana, K. L., Parker, S. L., Gokaslan, Z. L. & McGirt, M. J. Association of surgical resection and survival in patients with malignant primary osseous spinal neoplasms from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database. *Eur Spine J* **22**, 1375–1382 (2013).
 20. Dregghorn, C. R., Newman, R. J., Hardy, G. J. & Dickson, R. A. Primary tumors of the axial skeleton. Experience of the Leeds Regional Bone Tumor Registry. *Spine (Phila Pa 1976)* **15**, 137–140 (1990).
 21. Smoll, N. R., Gautschi, O. P., Radovanovic, I., Schaller, K. & Weber, D. C. Incidence and relative survival of chordomas: the standardized mortality ratio and the impact of chordomas on a population. *Cancer* **119**, 2029–2037 (2013).
 22. Gatta, G. *et al.* Burden and centralised treatment in Europe of rare tumours: results of RARECAREnet—a population-based study. *The Lancet Oncology* **18**, 1022–1039 (2017).
 23. McMaster, M. L., Goldstein, A. M., Bromley, C. M., Ishibe, N. & Parry, D. M. Chordoma: incidence and survival patterns in the United States, 1973–1995. *Cancer Causes Control* **12**, 1–11 (2001).
 24. Almefty, K., Pravdenkova, S., Colli, B. O., Al-Mefty, O. & Gokden, M. Chordoma and chondrosarcoma: similar, but quite different, skull base tumors. *Cancer* **110**, 2457–2467 (2007).
 25. Krishnan, S. *et al.* Radiosurgery for cranial base chordomas and chondrosarcomas. *Neurosurgery* **56**, 777–784; discussion 777–784 (2005).
 26. Cho, Y. H., Kim, J. H., Khang, S. K., Lee, J.-K. & Kim, C. J. Chordomas and chondrosarcomas of the skull base: comparative analysis of clinical results in 30 patients. *Neurosurg Rev* **31**, 35–43; discussion 43 (2008).
 27. Di Maio, S., Rostomily, R. & Sekhar, L. N. Current surgical outcomes for cranial base chordomas: cohort study of 95 patients. *Neurosurgery* **70**, 1355–1360; discussion 1360 (2012).
 28. Matsumoto, J., Towbin, R. B. & Ball, W. S. Cranial chordomas in infancy and childhood. A report of two cases and review of the literature. *Pediatr Radiol* **20**, 28–32 (1989).
 29. Hoch, B. L., Nielsen, G. P., Liebsch, N. J. & Rosenberg, A. E. Base of skull chordomas in children and adolescents: a clinicopathologic study of 73 cases. *Am J Surg Pathol* **30**, 811–818 (2006).
 30. Frezza, A. M., Botta, L., Trama, A., Dei Tos, A. P. & Stacchiotti, S. Chordoma: update on disease, epidemiology, biology and medical therapies. *Curr Opin Oncol* **31**, 114–120 (2019).
 31. Lucas, D. R. Dahlin's Bone Tumors: General Aspects and Data on 11,087 Cases. *Am J Clin Pathol* **106**, 693–693 (1996).
 32. Persson, S., Kindblom, L. G. & Angervall, L. Classical and chondroid chordoma. A light-microscopic, histochemical, ultrastructural and immunohistochemical analysis of the various cell types. *Pathol. Res. Pract.*

187, 828–838 (1991).

33. Yu, E., Koffer, P. P., DiPetrillo, T. A. & Kinsella, T. J. Incidence, Treatment, and Survival Patterns for Sacral Chordoma in the United States, 1974-2011. *Front Oncol* **6**, 203 (2016).

34. The WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone (Sarcomas). *Liddy Shriver Sarcoma Initiative*

<http://sarcomahelp.org/reviews/who-classification-sarcomas.html>.

35. O'Connell, J. X. *et al.* Base of skull chordoma. A correlative study of histologic and clinical features of 62 cases. *Cancer* **74**, 2261–2267 (1994).

36. Dickersin, R. G. *Diagnostic Electron Microscopy: A Text/Atlas*. (Springer Science & Business Media, 2006).

37. Friedmann, I., Harrison, D. F. N. & Bird, E. S. The fine structure of chordoma with particular reference to the physaliphorous cell. *J Clin Pathol* **15**, 116–125 (1962).

38. Gellner, V. *et al.* Establishment of clival chordoma cell line MUG-CC1 and lymphoblastoid cells as a model for potential new treatment strategies. *Sci Rep* **6**, 24195 (2016).

39. Heffelfinger, M. J., Dahlin, D. C., MacCarty, C. S. & Beabout, J. W. Chordomas and cartilaginous tumors at the skull base. *Cancer* **32**, 410–420 (1973).

40. Uhrenholt, L. & Stimpel, H. Histochemistry of Sacrococcygeal Chordoma. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series A:Pathology* **93A**, 203–204 (1985).

41. Crawford, T. The Staining Reactions of Chordoma. *J Clin Pathol* **11**, 110–113 (1958).

42. Mitchell, A. *et al.* Chordoma and chondroid neoplasms of the spheno-occiput. An immunohistochemical study of 41 cases with prognostic and nosologic implications. *Cancer* **72**, 2943–2949 (1993).

43. Forsyth, P. A. *et al.* Intracranial chordomas: a clinicopathological and prognostic study of 51 cases. *J. Neurosurg.* **78**, 741–747 (1993).

44. Rosenberg, A. E., Brown, G. A., Bhan, A. K. & Lee, J. M. Chondroid chordoma--a variant of chordoma. A morphologic and immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* **101**, 36–41 (1994).

45. Deficiency of PTEN and CDKN2A Tumor-Suppressor Genes in Conventional and Chondroid Chordomas: Molecular Characteristics and Clinical Relevance - PubMed.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32547095/>.

46. Miettinen, M., Lehto, V. P. & Virtanen, I. Malignant fibrous histiocytoma within a recurrent chordoma. A light microscopic, electron microscopic, and immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* **82**, 738–743 (1984).

47. Miettinen, M., Karaharju, E. & Järvinen, H. Chordoma with a massive spindle-cell sarcomatous transformation. A light- and electron-microscopic and immunohistological study. *Am J Surg Pathol* **11**, 563–570 (1987).

48. Meis, J. M., Raymond, A. K., Evans, H. L., Charles, R. E. & Giraldo, A. A. 'Dedifferentiated' chordoma. A clinicopathologic and immunohistochemical study of three cases. *Am J Surg Pathol* **11**, 516–525 (1987).

49. Fleming, G. F. *et al.* Dedifferentiated chordoma. Response to aggressive chemotherapy in two cases. *Cancer* **72**, 714–718 (1993).
50. Ikeda, H. *et al.* Dedifferentiated chordoma arising in irradiated sacral chordoma. *Radiat Med* **15**, 109–111 (1997).
51. Shih, A. R. *et al.* Clinicopathologic characteristics of poorly differentiated chordoma. *Mod. Pathol.* **31**, 1237–1245 (2018).
52. Chavez, J. A., Nasir Ud Din, null, Memon, A. & Perry, A. Anaplastic chordoma with loss of INI1 and brachyury expression in a 2-year-old girl. *Clin. Neuropathol.* **33**, 418–420 (2014).
53. Tauziède-Espariat, A. *et al.* Prognostic and Therapeutic Markers in Chordomas: A Study of 287 Tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* **75**, 111–120 (2016).
54. Antonelli, M. *et al.* SMARCB1/INI1 Involvement in Pediatric Chordoma: A Mutational and Immunohistochemical Analysis. *Am. J. Surg. Pathol.* **41**, 56–61 (2017).
55. Hasselblatt, M. *et al.* Poorly differentiated chordoma with SMARCB1/INI1 loss: a distinct molecular entity with dismal prognosis. *Acta Neuropathol.* **132**, 149–151 (2016).
56. Mobley, B. C. *et al.* Loss of SMARCB1/INI1 expression in poorly differentiated chordomas. *Acta Neuropathol.* **120**, 745–753 (2010).
57. Zhu, J., Kwan, K. M. & Mackem, S. Putative oncogene Brachyury (T) is essential to specify cell fate but dispensable for notochord progenitor proliferation and EMT. *PNAS* **113**, 3820–3825 (2016).
58. Kispert, A., Koschorz, B. & Herrmann, B. G. The T protein encoded by Brachyury is a tissue-specific transcription factor. *EMBO J* **14**, 4763–4772 (1995).
59. Showell, C., Binder, O. & Conlon, F. L. T-box genes in early embryogenesis. *Dev. Dyn.* **229**, 201–218 (2004).
60. Yang, X. R. *et al.* T (brachyury) gene duplication confers major susceptibility to familial chordoma. *Nat Genet* **41**, 1176–1178 (2009).
61. Pillay, N. *et al.* A common single-nucleotide variant in T is strongly associated with chordoma. *Nat Genet* **44**, 1185–1187 (2012).
62. Bettegowda, C. *et al.* Spinal column chordoma: prognostic significance of clinical variables and T (brachyury) gene SNP rs2305089 for local recurrence and overall survival. *Neuro-oncology* **19**, 405–413 (2017).
63. Otani, R. *et al.* Brachyury gene copy number gain and activation of the PI3K/Akt pathway: association with upregulation of oncogenic Brachyury expression in skull base chordoma. *J. Neurosurg.* **128**, 1428–1437 (2018).
64. Hallor, K. H. *et al.* Frequent deletion of the CDKN2A locus in chordoma: analysis of chromosomal imbalances using array comparative genomic hybridisation. *Br. J. Cancer* **98**, 434–442 (2008).
65. Frezza, A. M., Botta, L., Trama, A., Dei Tos, A. P. & Stacchiotti, S. Chordoma: update on disease, epidemiology, biology and medical therapies. *Curr Opin Oncol* **31**, 114–120 (2019).
66. Dalprà, L. *et al.* First cytogenetic study of a recurrent familial chordoma of the clivus. *Int J Cancer* **81**, 24–30 (1999).

67. Nibu, Y., José-Edwards, D. S. & Di Gregorio, A. From notochord formation to hereditary chordoma: the many roles of Brachyury. *Biomed Res Int* **2013**, 826435 (2013).
68. Mertens, F. *et al.* Clonal chromosome aberrations in three sacral chordomas. *Cancer Genet Cytogenet* **73**, 147–151 (1994).
69. Yang, C. *et al.* Deficiency of PTEN and CDKN2A Tumor-Suppressor Genes in Conventional and Chondroid Chordomas: Molecular Characteristics and Clinical Relevance. *Onco Targets Ther* **13**, 4649–4663 (2020).
70. Wang, L. *et al.* Genomic aberrations frequently alter chromatin regulatory genes in chordoma. *Genes Chromosomes Cancer* **55**, 591–600 (2016).
71. Stephens, P. J. *et al.* Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* **144**, 27–40 (2011).
72. Tarpey, P. S. *et al.* The driver landscape of sporadic chordoma. *Nat Commun* **8**, 890 (2017).
73. Vinagre, J. *et al.* Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun* **4**, 2185 (2013).
74. Koelsche, C. *et al.* Distribution of TERT promoter mutations in pediatric and adult tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol.* **126**, 907–915 (2013).
75. Horn, S. *et al.* TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* **339**, 959–961 (2013).
76. Bettegowda, C. *et al.* Prognostic significance of hTERT (human telomerase reverse transcriptase) promoter region mutations C228T and C250T for overall survival in spinal chordomas. *Neuro-oncology* (2019) doi:10.1093/neuonc/noz066.
77. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 57–63 (2009).
78. Schwab, J. H. *et al.* Chordoma and chondrosarcoma gene profile: implications for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **58**, 339–349 (2009).
79. Bell, D., Raza, S. M., Bell, A. H., Fuller, G. N. & DeMonte, F. Whole-transcriptome analysis of chordoma of the skull base. *Virchows Arch.* **469**, 439–449 (2016).
80. Bell, A. H. *et al.* Transcriptome comparison identifies potential biomarkers of spine and skull base chordomas. *Virchows Arch.* **472**, 489–497 (2018).
81. Aebersold, R. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198–207 (2003).
82. Chen, S. *et al.* Differential proteomic profiling of primary and recurrent chordomas. *Oncology Reports* **33**, 2207–2218 (2015).
83. Zhou, H. *et al.* Differential proteomic profiling of chordomas and analysis of prognostic factors. *J Surg Oncol* **102**, 720–727 (2010).
84. Dawson, M. A. & Kouzarides, T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* **150**, 12–27 (2012).
85. Alholle, A. *et al.* Genome-wide DNA methylation profiling of

- recurrent and non-recurrent chordomas. *Epigenetics* **10**, 213–220 (2015).
86. Rinner, B. *et al.* Chordoma Characterization of Significant Changes of the DNA Methylation Pattern. *PLoS One* **8**, (2013).
 87. Longoni, M. *et al.* Evaluation of 1p36 markers and clinical outcome in a skull base chordoma study. *Neuro-oncology* **10**, 52–60 (2008).
 88. Le, L. P. *et al.* Recurrent Chromosomal Copy Number Alterations in Sporadic Chordomas. *PLoS One* **6**, (2011).
 89. Scheipl, S. *et al.* Histone deacetylase inhibitors as potential therapeutic approaches for chordoma: an immunohistochemical and functional analysis. *J. Orthop. Res.* **31**, 1999–2005 (2013).
 90. Duan, Z. *et al.* Differential expression of microRNA (miRNA) in chordoma reveals a role for miRNA-1 in Met expression. *J. Orthop. Res.* **28**, 746–752 (2010).
 91. Duan, Z. *et al.* Prognostic significance of miRNA-1 (miR-1) expression in patients with chordoma. *J. Orthop. Res.* **32**, 695–701 (2014).
 92. Osaka, E. *et al.* MicroRNA-1 (miR-1) inhibits chordoma cell migration and invasion by targeting slug. *J. Orthop. Res.* **32**, 1075–1082 (2014).
 93. Zou, M.-X. *et al.* Reduced expression of miRNA-1237-3p associated with poor survival of spinal chordoma patients. *Eur Spine J* **24**, 1738–1746 (2015).
 94. Bayrak, O. F. *et al.* MicroRNA expression profiling reveals the potential function of microRNA-31 in chordomas. *J. Neurooncol.* **115**, 143–151 (2013).
 95. Kuang, L. *et al.* Overexpression of adenosine deaminase acting on RNA 1 in chordoma tissues is associated with chordoma pathogenesis by reducing miR-125a and miR-10a expression. *Mol Med Rep* **12**, 93–98 (2015).
 96. Zhang, Y., Schiff, D., Park, D. & Abounader, R. MicroRNA-608 and microRNA-34a regulate chordoma malignancy by targeting EGFR, Bcl-xL and MET. *PLoS ONE* **9**, e91546 (2014).
 97. Scheil-Bertram, S. *et al.* Molecular profiling of chordoma. *International Journal of Oncology* **44**, 1041–1055 (2014).
 98. Brüderlein, S. *et al.* Molecular characterization of putative chordoma cell lines. *Sarcoma* **2010**, 630129 (2010).
 99. Yang, C. *et al.* Characterization and Analysis of Human Chordoma Cell Lines. *Spine (Phila Pa 1976)* **35**, 1257–1264 (2010).
 100. Rinner, B. *et al.* Establishment and detailed functional and molecular genetic characterisation of a novel sacral chordoma cell line, MUG-Chor1. *Int. J. Oncol.* **40**, 443–451 (2012).
 101. Hsu, W. *et al.* Generation of chordoma cell line JHC7 and the identification of Brachyury as a novel molecular target: Laboratory investigation. *Journal of Neurosurgery* **115**, 760–769 (2011).
 102. Liu, X. *et al.* Establishment and characterization of a novel chordoma cell line: CH22. *J. Orthop. Res.* **30**, 1666–1673 (2012).
 103. von Witzleben, A. *et al.* Preclinical Characterization of Novel Chordoma Cell Systems and Their Targeting by Pharmacological Inhibitors of the CDK4/6 Cell-Cycle Pathway. *Cancer Res.* **75**, 3823–3831 (2015).

104. Jäger, D. *et al.* U-CH17P, -M and -S, a new cell culture system for tumor diversity and progression in chordoma. *Int. J. Cancer* **142**, 1369–1378 (2018).
105. Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E. & Solomon, F. D. P. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol* **230**, 16–26 (2015).
106. Langhans, S. A. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol* **9**, 6 (2018).
107. Lang, L. *et al.* Simultaneously inactivating Src and AKT by saracatinib/capivasertib co-delivery nanoparticles to improve the efficacy of anti-Src therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *J Hematol Oncol* **12**, 132 (2019).
108. Yan, S., Broussard, G., De, K., Bernstein, A. & Wang, Y. SU-F-T-203: High Dose Definitive Proton Therapy with Integrated Boost to Hypoxic Subvolumes Determined by [18F]-Fluoromisonidazole (FMISO) PET/CT for Patients with Recurrent Chordomas Using Intensity Modulated Proton Therapy (IMPT). *Medical Physics* **43**, 3508–3509 (2016).
109. Langhans, S. A. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol* **9**, (2018).
110. Haisler, W. L. *et al.* Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nat Protoc* **8**, 1940–1949 (2013).
111. Imamura, Y. *et al.* Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep* **33**, 1837–1843 (2015).
112. Kundu, B., Saha, P., Datta, K. & Kundu, S. C. A silk fibroin based hepatocarcinoma model and the assessment of the drug response in hyaluronan-binding protein 1 overexpressed HepG2 cells. *Biomaterials* **34**, 9462–9474 (2013).
113. Storch, K. *et al.* Three-dimensional cell growth confers radioresistance by chromatin density modification. *Cancer Res* **70**, 3925–3934 (2010).
114. Ruiz-Garcia, H., Alvarado-Estrada, K., Schiapparelli, P., Quinones-Hinojosa, A. & Trifiletti, D. M. Engineering Three-Dimensional Tumor Models to Study Glioma Cancer Stem Cells and Tumor Microenvironment. *Front Cell Neurosci* **14**, 558381 (2020).
115. Bai, C. *et al.* Associations of chemo- and radio-resistant phenotypes with the gap junction, adhesion and extracellular matrix in a three-dimensional culture model of soft sarcoma. *J Exp Clin Cancer Res* **34**, 58 (2015).
116. Nunes, A. S., Barros, A. S., Costa, E. C., Moreira, A. F. & Correia, I. J. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnol Bioeng* **116**, 206–226 (2019).
117. Koch, J. *et al.* Three dimensional cultivation increases chemo- and radioresistance of colorectal cancer cell lines. *PLOS ONE* **16**, e0244513 (2021).
118. Siu, I.-M. *et al.* Establishment and characterization of a primary human chordoma xenograft model. *J Neurosurg* **116**, 801–809 (2012).

119. Trucco, M. M. *et al.* A novel chordoma xenograft allows in vivo drug testing and reveals the importance of NF- κ B signaling in chordoma biology. *PLoS One* **8**, e79950 (2013).
120. Davies, J. M. *et al.* Generation of a patient-derived chordoma xenograft and characterization of the phosphoproteome in a recurrent chordoma. *J. Neurosurg.* **120**, 331–336 (2014).
121. Owen, J. H. *et al.* UM-Chor1: establishment and characterization of the first validated clival chordoma cell line. *Journal of Neurosurgery* **128**, 701–709 (2017).
122. Bozzi, F. *et al.* Development of transplantable human chordoma xenograft for preclinical assessment of novel therapeutic strategies. *Neuro Oncol* **16**, 72–80 (2014).
123. Karikari, I. O. *et al.* Molecular characterization of chordoma xenografts generated from a novel primary chordoma cell source and two chordoma cell lines. *J Neurosurg Spine* **21**, 386–393 (2014).
124. Presneau, N. *et al.* Role of the transcription factor T (brachyury) in the pathogenesis of sporadic chordoma: a genetic and functional-based study. *J. Pathol.* **223**, 327–335 (2011).
125. Salle, H. *et al.* Development of a Novel Orthotopic Primary Human Chordoma Xenograft Model: A Relevant Support for Future Research on Chordoma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **79**, 314–324 (2020).
126. Diaz, R. J. *et al.* Characterization of a Clival Chordoma Xenograft Model Reveals Tumor Genomic Instability. *Am. J. Pathol.* **188**, 2902–2911 (2018).
127. Magnaghi, P. *et al.* Afatinib Is a New Therapeutic Approach in Chordoma with a Unique Ability to Target EGFR and Brachyury. *Mol Cancer Ther* **17**, 603–613 (2018).
128. Walker, C. J. *et al.* Bioinformatic analysis of selinexor-induced gene expression in patient-derived-chordomas to reveal mechanisms of action leading to tumor growth inhibition. *JCO* **38**, e23502–e23502 (2020).
129. Magnaghi, P. *et al.* Afatinib Is a New Therapeutic Approach in Chordoma with a Unique Ability to Target EGFR and Brachyury. *Mol Cancer Ther* **17**, 603–613 (2018).
130. Aggarwal, B. B., Danda, D., Gupta, S. & Gehlot, P. Models for prevention and treatment of cancer: problems vs promises. *Biochem Pharmacol* **78**, 1083–1094 (2009).
131. Li, Q. *et al.* 3D models of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer metastasis: high-throughput screening assay development, validation, and pilot screen. *J Biomol Screen* **16**, 141–154 (2011).
132. Weiswald, L.-B., Bellet, D. & Dangles-Marie, V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* **17**, 1–15 (2015).
133. Durand, R. E. & Sutherland, R. M. Effects of intercellular contact on repair of radiation damage. *Exp Cell Res* **71**, 75–80 (1972).
134. Xu, Z. *et al.* Application of a microfluidic chip-based 3D co-culture to test drug sensitivity for individualized treatment of lung cancer. *Biomaterials* **34**, 4109–4117 (2013).
135. Castiaux, A. D., Spence, D. M. & Martin, R. S. Review of 3D Cell Culture with Analysis in Microfluidic Systems. *Anal Methods* **11**, 4220–

4232 (2019).

136. Godugu, C. *et al.* AlgiMatrix™ based 3D cell culture system as an in-vitro tumor model for anticancer studies. *PLoS One* **8**, e53708 (2013).

137. Lee, J., Cuddihy, M. J. & Kotov, N. A. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev* **14**, 61–86 (2008).

138. Gaebler, M. *et al.* Three-Dimensional Patient-Derived In Vitro Sarcoma Models: Promising Tools for Improving Clinical Tumor Management. *Front Oncol* **7**, (2017).

139. Jastrzebska, K. *et al.* Silk as an innovative biomaterial for cancer therapy. *Rep Pract Oncol Radiother* **20**, 87–98 (2015).

140. Lamhamedi-Cherradi, S.-E. *et al.* 3D Tissue-Engineered Model of Ewing Sarcoma. *Adv Drug Deliv Rev* **0**, 155–171 (2014).

141. Fujita, N. *et al.* Chordoma-derived cell line U-CH1-N recapitulates the biological properties of notochordal nucleus pulposus cells. *J. Orthop. Res.* **34**, 1341–1350 (2016).

142. Scognamiglio, G. *et al.* Patient-derived organoids as a potential model to predict response to PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitors. *Br J Cancer* **121**, 979–982 (2019).

143. Costa, E. C. *et al.* 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol Adv* **34**, 1427–1441 (2016).

144. Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F. & Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev Technol* **12**, 207–218 (2014).

145. Pontes Soares, C. *et al.* 2D and 3D-organized cardiac cells shows differences in cellular morphology, adhesion junctions, presence of myofibrils and protein expression. *PLoS One* **7**, e38147 (2012).

146. Heery, C. R. Chordoma: The Quest for Better Treatment Options. *Oncol Ther* **4**, 35–51 (2016).

147. Walcott, B. P. *et al.* Chordoma: current concepts, management, and future directions. *Lancet Oncol.* **13**, e69–76 (2012).

148. Vrionis, F. D. Chordomas and Chondrosarcomas of the Skull Base and Spine. *Neuro Oncol* **6**, 166–167 (2004).

149. Barges-Coll, J. *et al.* Avoiding injury to the abducens nerve during expanded endonasal endoscopic surgery: anatomic and clinical case studies. *Neurosurgery* **67**, 144–154; discussion 154 (2010).

150. Al-Mefty, O., Colli, B. O., Angtuaco, E. J. & Hug, E. B. Chapter 48 - Chordomas and Chondrosarcomas of the Cranial Base. in *Textbook of Neuro-Oncology* (eds. Berger, M. S. *et al.*) 357–365 (W.B. Saunders, 2005). doi:10.1016/B978-0-7216-8148-1.50051-6.

151. Gay, E. *et al.* Chordomas and chondrosarcomas of the cranial base: results and follow-up of 60 patients. *Neurosurgery* **36**, 887–896; discussion 896–897 (1995).

152. Raffel, C., Wright, D. C., Gutin, P. H. & Wilson, C. B. Cranial chordomas: clinical presentation and results of operative and radiation therapy in twenty-six patients. *Neurosurgery* **17**, 703–710 (1985).

153. Franquemont, D. W., Katsetos, C. D. & Ross, G. W. Fatal acute pontocerebellar hemorrhage due to an unsuspected sphenoccipital

- chordoma. *Arch Pathol Lab Med* **113**, 1075–1078 (1989).
154. Nakau, R., Kamiyama, H., Kazumata, K. & Andou, M. Subarachnoid hemorrhage associated with clival chordoma--case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)* **43**, 605–607 (2003).
155. Healey, J. H. & Lane, J. M. Chordoma: a critical review of diagnosis and treatment. *Orthop Clin North Am* **20**, 417–426 (1989).
156. Klekamp, J. & Samii, M. *Surgery of Spinal Tumors*. (Springer-Verlag, 2007). doi:10.1007/978-3-540-44715-3.
157. York, J. E. *et al.* Sacral chordoma: 40-year experience at a major cancer center. *Neurosurgery* **44**, 74–79; discussion 79-80 (1999).
158. Boriani, S. *et al.* Chordoma of the mobile spine: fifty years of experience. *Spine (Phila Pa 1976)* **31**, 493–503 (2006).
159. Leone, A., Cerase, A., Tarquini, E. & Mulè, A. Chordoma of the low cervical spine presenting with Horner's syndrome. *Eur Radiol* **12**, S43–S47 (2002).
160. Stacchiotti, S., Sommer, J., & Chordoma Global Consensus Group. Building a global consensus approach to chordoma: a position paper from the medical and patient community. *Lancet Oncol.* **16**, e71-83 (2015).
161. J, L., J, P., S, A., S, B. & A, C. Primary Tumors of the Sacrum: Diagnostic Imaging. *AJR. American journal of roentgenology* vol. 174 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10658718/?dopt=Abstract> (2000).
162. Kishimoto, R. *et al.* Imaging characteristics of metastatic chordoma. *Jpn J Radiol* **30**, 509–516 (2012).
163. Nishiguchi, T. *et al.* Differentiating Benign Notochordal Cell Tumors From Chordomas: Radiographic Features on MRI, CT, and Tomography. *American Journal of Roentgenology* **196**, 644–650 (2011).
164. Salisbury, J. R. & Isaacson, P. G. Demonstration of cytokeratins and an epithelial membrane antigen in chordomas and human fetal notochord. *Am. J. Surg. Pathol.* **9**, 791–797 (1985).
165. Naka, T. *et al.* Cytokeratin subtyping in chordomas and the fetal notochord: an immunohistochemical analysis of aberrant expression. *Mod. Pathol.* **10**, 545–551 (1997).
166. S, S. *et al.* Best Practices for the Management of Local-Regional Recurrent Chordoma: A Position Paper by the Chordoma Global Consensus Group. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* vol. 28 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28184416/> (2017).
167. Radaelli, S. *et al.* The sacral chordoma margin. *European Journal of Surgical Oncology* (2020) doi:10.1016/j.ejso.2020.04.028.
168. C, W. *et al.* A Uniform Residual Tumor (R) Classification: Integration of the R Classification and the Circumferential Margin Status. *Cancer* vol. 115 https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/19536900/?from_single_result=A+uniform+residual+tumor+%28R%29+classification%3A+integration+of+the+R+classification+and+the+circumferential+margin+status&expanded_search_query=A+uniform+residual+tumor+%28R%29+classification%3A+integration+of+the+R+classification+and+the+circumferential+margin+status (2009).

169. Baumann, B. C. *et al.* A prospective clinical trial of proton therapy for chordoma and chondrosarcoma: Feasibility assessment. *J Surg Oncol* **120**, 200–205 (2019).
170. Indelicato, D. J. *et al.* A Prospective Outcomes Study of Proton Therapy for Chordomas and Chondrosarcomas of the Spine. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **95**, 297–303 (2016).
171. Youn, S. H. *et al.* Clinical outcome of proton therapy for patients with chordomas. *Radiat Oncol J* **36**, 182–191 (2018).
172. Chen, Y.-L. *et al.* Definitive high-dose photon/proton radiotherapy for unresected mobile spine and sacral chordomas. *Spine (Phila Pa 1976)* **38**, E930–936 (2013).
173. Tran, S. *et al.* Early results and volumetric analysis after spot-scanning proton therapy with concomitant hyperthermia in large inoperable sacral chordomas. *Br J Radiol* **93**, 20180883 (2020).
174. Beddok, A. *et al.* High-dose proton therapy and tomotherapy for the treatment of sacral chordoma: a retrospective monocentric study. *Acta Oncol* 1–7 (2020) doi:10.1080/0284186X.2020.1834140.
175. Snider, J. W. *et al.* Long-Term Outcomes and Prognostic Factors After Pencil-Beam Scanning Proton Radiation Therapy for Spinal Chordomas: A Large, Single-Institution Cohort. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **101**, 226–233 (2018).
176. Aibe, N. *et al.* Outcomes of Patients With Primary Sacral Chordoma Treated With Definitive Proton Beam Therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **100**, 972–979 (2018).
177. Holliday, E. B. *et al.* Postoperative proton therapy for chordomas and chondrosarcomas of the spine: adjuvant versus salvage radiation therapy. *Spine (Phila Pa 1976)* **40**, 544–549 (2015).
178. Palm, R. F. *et al.* The role of dose escalation and proton therapy in perioperative or definitive treatment of chondrosarcoma and chordoma: An analysis of the National Cancer Data Base. *Cancer* **125**, 642–651 (2019).
179. Dial, B. L. *et al.* The Role of Radiotherapy for Chordoma Patients Managed with Surgery: Analysis of the National Cancer Database. *Spine (Phila Pa 1976)* **45**, E742–E751 (2020).
180. Bhattacharya, P., Shetake, N. G., Pandey, B. N. & Kumar, A. Receptor tyrosine kinase signaling in cancer radiotherapy and its targeting for tumor radiosensitization. *Int J Radiat Biol* **94**, 628–644 (2018).
181. Scheipl, S. *et al.* EGFR inhibitors identified as a potential treatment for chordoma in a focused compound screen. *J. Pathol.* **239**, 320–334 (2016).
182. S, S. *et al.* Phase II Study on Lapatinib in Advanced EGFR-positive Chordoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* vol. 24
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23559153/?from_single_result=Phase+II+study+on+lapatinib+in+advanced+EGFR-positive+chordoma&expanded_search_query=Phase+II+study+on+lapatinib+in+advanced+EGFR-positive+chordoma (2013).
183. Zhai, Y. *et al.* Analysis of clinical factors and PDGFR- β in predicting

- prognosis of patients with clival chordoma. *J Neurosurg* **129**, 1429–1437 (2018).
184. Lee, D.-H. *et al.* Combined PDGFR and HDAC Inhibition Overcomes PTEN Disruption in Chordoma. *PLoS ONE* **10**, e0134426 (2015).
185. Adenis, A. *et al.* A dose-escalating phase I of imatinib mesylate with fixed dose of metronomic cyclophosphamide in targeted solid tumours. *Br J Cancer* **109**, 2574–2578 (2013).
186. Cote, G. M. *et al.* A Phase 1 Study of Nilotinib Plus Radiation in High-Risk Chordoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **102**, 1496–1504 (2018).
187. D’Agati, G. *et al.* Active receptor tyrosine kinases, but not Brachyury, are sufficient to trigger chordoma in zebrafish. *Dis Model Mech* **12**, (2019).
188. George, S. *et al.* Multicenter phase II trial of sunitinib in the treatment of nongastrointestinal stromal tumor sarcomas. *J Clin Oncol* **27**, 3154–3160 (2009).
189. Lebellec, L. *et al.* Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) as predictive factor of progression-free survival in patients with advanced chordoma receiving sorafenib: an analysis from a phase II trial of the french sarcoma group (GSF/GETO). *Oncotarget* **7**, 73984–73994 (2016).
190. Han, S. *et al.* Aberrant hyperactivation of akt and Mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in sporadic chordomas. *Clin Cancer Res* **15**, 1940–1946 (2009).
191. Schwab, J. *et al.* Combination of PI3K/mTOR inhibition demonstrates efficacy in human chordoma. *Anticancer Res* **29**, 1867–1871 (2009).
192. Ricci-Vitiani, L. *et al.* Chemotherapy of skull base chordoma tailored on responsiveness of patient-derived tumor cells to rapamycin. *Neoplasia* **15**, 773–782 (2013).
193. Stacchiotti, S. *et al.* Imatinib and everolimus in patients with progressing advanced chordoma: A phase 2 clinical study. *Cancer* **124**, 4056–4063 (2018).
194. Collins, J. M. *et al.* Phase I Trial of a Modified Vaccinia Ankara Priming Vaccine Followed by a Fowlpox Virus Boosting Vaccine Modified to Express Brachyury and Costimulatory Molecules in Advanced Solid Tumors. *Oncologist* **25**, 560-e1006 (2020).
195. DeMaria, P. J. *et al.* A randomized, double-blind, phase II clinical trial of GI-6301 (yeast-brachyury vaccine) versus placebo in combination with standard of care definitive radiotherapy in locally advanced, unresectable, chordoma. *JCO* **38**, 11527–11527 (2020).
196. Radiobiologie - Maurice Tubiana, Jean Dutreix, André Wambersie - Google Livres.
https://books.google.fr/books/about/Radiobiologie.html?id=vvQ7AAAACA AJ&redir_esc=y.
197. Emami, B. *et al.* Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **21**, 109–122 (1991).
198. Maier, P., Wenz, F. & Herskind, C. Radioprotection of normal tissue cells. *Strahlenther Onkol* **190**, 745–752 (2014).
199. Ward, J. F. Biochemistry of DNA lesions. *Radiat Res Suppl* **8**, S103-

- 111 (1985).
200. Herskind, C. & Westergaard, O. Inactivation of a Single Eucaryotic Gene Irradiated in Vitro in Transcriptionally Active Chromatin Form. *Radiat Res* **106**, 331–344 (1986).
201. Herskind, C. & Westergaard, O. Variable protection by OH scavengers against radiation-induced inactivation of isolated transcriptionally active chromatin: the influence of secondary radicals. *Radiat Res* **114**, 28–41 (1988).
202. Radiobiology for the Radiologist.
<https://shop.lww.com/Radiobiology-for-the-Radiologist/p/9781496335418>.
203. Shiloh, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**, 155–168 (2003).
204. Abraham, R. T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**, 2177–2196 (2001).
205. Lukas, J., Lukas, C. & Bartek, J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* **3**, 997–1007 (2004).
206. Zhou, B.-B. S. & Bartek, J. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer* **4**, 216–225 (2004).
207. Reinhardt, H. C. & Schumacher, B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet* **28**, 128–136 (2012).
208. Pflaum, J., Schlosser, S. & Müller, M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol* **4**, 285 (2014).
209. Weinberg, W. C. & Denning, M. F. P21Waf1 control of epithelial cell cycle and cell fate. *Crit Rev Oral Biol Med* **13**, 453–464 (2002).
210. Smits, V. A. *et al.* p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J Biol Chem* **275**, 30638–30643 (2000).
211. Boutros, R., Lobjois, V. & Ducommun, B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* **7**, 495–507 (2007).
212. Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N. & Lieber, M. R. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 495–506 (2017).
213. Ceccaldi, R., Rondinelli, B. & D’Andrea, A. D. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol* **26**, 52–64 (2016).
214. Wright, W. D., Shah, S. S. & Heyer, W.-D. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* **293**, 10524–10535 (2018).
215. Vousden, K. H. p53: death star. *Cell* **103**, 691–694 (2000).
216. Harms, K., Nozell, S. & Chen, X. The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell Mol Life Sci* **61**, 822–842 (2004).
217. Sheard, M. A. Ionizing radiation as a response-enhancing agent for

- CD95-mediated apoptosis. *Int J Cancer* **96**, 213–220 (2001).
218. Scaffidi, C. *et al.* Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **17**, 1675–1687 (1998).
219. Chen, Q., Crosby, M. & Almasan, A. Redox Regulation of Apoptosis before and after Cytochrome C Release. *Korean J Biol Sci* **7**, 1–9 (2003).
220. Richter, C. & Kass, G. E. Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular Ca²⁺ homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation. *Chem Biol Interact* **77**, 1–23 (1991).
221. Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. & D’Orazi, G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)* **8**, 603–619 (2016).
222. Kolesnick, R. The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest* **110**, 3–8 (2002).
223. Lin, T. *et al.* Role of acidic sphingomyelinase in Fas/CD95-mediated cell death. *J Biol Chem* **275**, 8657–8663 (2000).
224. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* **25**, 486–541 (2018).
225. Castedo, M. *et al.* Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **23**, 2825–2837 (2004).
226. de Jong, Y. *et al.* Radiotherapy resistance in chondrosarcoma cells; a possible correlation with alterations in cell cycle related genes. *Clin Sarcoma Res* **9**, 9 (2019).
227. Ran, Q. *et al.* CRIF1 as a potential target to improve the radiosensitivity of osteosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 20511–20516 (2019).
228. Petragnano, F. *et al.* Clinically relevant radioresistant rhabdomyosarcoma cell lines: functional, molecular and immune-related characterization. *J Biomed Sci* **27**, 90 (2020).
229. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C. C. p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49–53 (1991).
230. Thoenen, E., Curl, A. & Iwakuma, T. TP53 in bone and soft tissue sarcomas. *Pharmacol Ther* **202**, 149–164 (2019).
231. Casey, D. L. *et al.* p53 Pathway Mutations Increase Radioresistance in Rhabdomyosarcoma and Ewing Sarcoma. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* **108**, S179 (2020).
232. Zhu, G. *et al.* Mutant p53 in Cancer Progression and Targeted Therapies. *Front Oncol* **10**, 595187 (2020).
233. Ernst, A. *et al.* HSP90 inhibition as a means of radiosensitizing resistant, aggressive soft tissue sarcomas. *Cancer Lett* **365**, 211–222 (2015).
234. Rello-Varona, S. *et al.* The Importance of Being Dead: Cell Death Mechanisms Assessment in Anti-Sarcoma Therapy. *Front Oncol* **5**, (2015).
235. Kim, D. W. *et al.* Targeting of cell survival genes using small interfering RNAs (siRNAs) enhances radiosensitivity of Grade II chondrosarcoma cells. *J Orthop Res* **25**, 820–828 (2007).
236. Greve, B. *et al.* Survivin, a target to modulate the radiosensitivity of

- Ewing's sarcoma. *Strahlenther Onkol* **188**, 1038–1047 (2012).
237. Cheney, M. D. *et al.* 18F-FMISO PET/CT Visualization of Tumor Hypoxia in Patients with Chordoma of the Mobile and Sacrococcygeal Spine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **90**, 1030–1036 (2014).
238. Brenner, W., Conrad, E. U. & Eary, J. F. FDG PET imaging for grading and prediction of outcome in chondrosarcoma patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **31**, 189–195 (2004).
239. Harrison, D. J., Parisi, M. T. & Shulkin, B. L. The Role of 18F-FDG-PET/CT in Pediatric Sarcoma. *Semin Nucl Med* **47**, 229–241 (2017).
240. Rajendran, J. G. *et al.* [(18)F]FMISO and [(18)F]FDG PET imaging in soft tissue sarcomas: correlation of hypoxia, metabolism and VEGF expression. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **30**, 695–704 (2003).
241. Brizel, D. M. *et al.* Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* **56**, 941–943 (1996).
242. Nordmark, M. *et al.* Hypoxia in human soft tissue sarcomas: adverse impact on survival and no association with p53 mutations. *Br J Cancer* **84**, 1070–1075 (2001).
243. Schroeder, H. *et al.* Comparison of internal reference tissues for 18F-FMISO PET/CT in determination of hypoxic subvolume in patients undergoing radiation therapy for chordoma. *J Nucl Med* **57**, 1521–1521 (2016).
244. Hypoxia and Predicting Radiation Response - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26384274/>.
245. Yang, Q.-C. *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in human osteosarcoma: correlation with clinicopathological parameters and survival outcome. *Jpn J Clin Oncol* **37**, 127–134 (2007).
246. Bernauer, C. *et al.* Hypoxia and its therapeutic possibilities in paediatric cancers. *Br J Cancer* (2020) doi:10.1038/s41416-020-01107-w.
247. Brown, J. M. & Wilson, W. R. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* **4**, 437–447 (2004).
248. Wang, H., Jiang, H., Van De Gucht, M. & De Ridder, M. Hypoxic Radioresistance: Can ROS Be the Key to Overcome It? *Cancers (Basel)* **11**, (2019).
249. Rey, S., Schito, L., Koritzinsky, M. & Wouters, B. G. Molecular targeting of hypoxia in radiotherapy. *Adv Drug Deliv Rev* **109**, 45–62 (2017).
250. Knowles, H. J., Schaefer, K.-L., Dirksen, U. & Athanasou, N. A. Hypoxia and hypoglycaemia in Ewing's sarcoma and osteosarcoma: regulation and phenotypic effects of Hypoxia-Inducible Factor. *BMC Cancer* **10**, 372 (2010).
251. Zhang, M. *et al.* HIF-1 Alpha Regulates the Response of Primary Sarcomas to Radiation Therapy through a Cell Autonomous Mechanism. *Radiat Res* **183**, 594–609 (2015).
252. Levy, J. M. M., Towers, C. G. & Thorburn, A. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* **17**, 528–542 (2017).
253. Wu, S.-B. & Wei, Y.-H. AMPK-mediated increase of glycolysis as an adaptive response to oxidative stress in human cells: implication of the

- cell survival in mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 233–247 (2012).
254. Feng, H. *et al.* Hypoxia-induced autophagy as an additional mechanism in human osteosarcoma radioresistance. *J Bone Oncol* **5**, 67–73 (2016).
255. Mydin, R. B. S. M. N. & Okekpa, S. I. Reactive Oxygen Species, Cellular Redox Homeostasis and Cancer. *Homeostasis - An Integrated Vision* (2018) doi:10.5772/intechopen.76096.
256. Popadiuk, S., Renke, J., Woźniak, M. & Korzon, M. [Does chemotherapy and radiotherapy influence the level of oxidative stress in children with malignant bone tumours?]. *Med Wieku Rozwoj* **10**, 855–859 (2006).
257. Marampon, F. *et al.* NRF2 orchestrates the redox regulation induced by radiation therapy, sustaining embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma cells radioresistance. *J Cancer Res Clin Oncol* **145**, 881–893 (2019).
258. Teicher, B. A. Searching for molecular targets in sarcoma. *Biochem Pharmacol* **84**, 1–10 (2012).
259. Wicha, M. S., Liu, S. & Dontu, G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* **66**, 1883–1890; discussion 1895–1896 (2006).
260. Cruz, M. H., Sidén, A., Calaf, G. M., Delwar, Z. M. & Yakisich, J. S. The stemness phenotype model. *ISRN Oncol* **2012**, 392647 (2012).
261. Wang, L., Park, P., Zhang, H., La Marca, F. & Lin, C.-Y. Prospective identification of tumorigenic osteosarcoma cancer stem cells in OS99-1 cells based on high aldehyde dehydrogenase activity. *Int J Cancer* **128**, 294–303 (2011).
262. Taubert, H. *et al.* Stem cell-associated genes are extremely poor prognostic factors for soft-tissue sarcoma patients. *Oncogene* **26**, 7170–7174 (2007).
263. Genadry, K. C., Pietrobono, S., Rota, R. & Linardic, C. M. Soft Tissue Sarcoma Cancer Stem Cells: An Overview. *Front Oncol* **8**, (2018).
264. Schulz, A., Meyer, F., Dubrovskaja, A. & Borgmann, K. Cancer Stem Cells and Radioresistance: DNA Repair and Beyond. *Cancers (Basel)* **11**, (2019).
265. Luo, M. *et al.* FOXO3a knockdown promotes radioresistance in nasopharyngeal carcinoma by inducing epithelial-mesenchymal transition and the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cancer Lett* **455**, 26–35 (2019).
266. Najafi, M., Mortezaee, K. & Majidpoor, J. Cancer stem cell (CSC) resistance drivers. *Life Sci* **234**, 116781 (2019).
267. Chang, L. *et al.* Cancer stem cells and signaling pathways in radioresistance. *Oncotarget* **7**, 11002–11017 (2016).
268. Atashzar, M. R. *et al.* Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. *J Cell Physiol* **235**, 790–803 (2020).
269. Venkatesh, V. *et al.* Targeting Notch signalling pathway of cancer stem cells. *Stem Cell Investig* **5**, 5 (2018).
270. Lee, S. Y. *et al.* Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype,

- and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. *Mol Cancer* **16**, 10 (2017).
271. Zhao, D. *et al.* NOTCH-induced aldehyde dehydrogenase 1A1 deacetylation promotes breast cancer stem cells. *J Clin Invest* **124**, 5453–5465 (2014).
272. Arnold, C. R., Mangesius, J., Skvortsova, I.-I. & Ganswindt, U. The Role of Cancer Stem Cells in Radiation Resistance. *Front Oncol* **10**, 164 (2020).
273. Kang, M. K. *et al.* Potential identity of multi-potential cancer stem-like subpopulation after radiation of cultured brain glioma. *BMC Neurosci* **9**, 15 (2008).
274. Desai, A., Webb, B. & Gerson, S. L. CD133+ cells contribute to radioresistance via altered regulation of DNA repair genes in human lung cancer cells. *Radiother Oncol* **110**, 538–545 (2014).
275. Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756–760 (2006).
276. Plaks, V., Kong, N. & Werb, Z. The Cancer Stem Cell Niche: How Essential is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells? *Cell Stem Cell* **16**, 225–238 (2015).
277. Liang, W. S. *et al.* Identification of therapeutic targets in chordoma through comprehensive genomic and transcriptomic analyses. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* **4**, a003418 (2018).
278. Yakkioui, Y. *et al.* A comparison of cell-cycle markers in skull base and sacral chordomas. *World Neurosurg* **82**, e311–318 (2014).
279. Cottone, L. *et al.* Frequent alterations in p16/CDKN2A identified by immunohistochemistry and FISH in chordoma. *J Pathol Clin Res* **6**, 113–123 (2020).
280. Matsuno, A. *et al.* Immunohistochemical examination of proliferative potentials and the expression of cell cycle-related proteins of intracranial chordomas. *Hum Pathol* **28**, 714–719 (1997).
281. Sakai, K., Hongo, K., Tanaka, Y. & Nakayama, J. Analysis of immunohistochemical expression of p53 and the proliferation marker Ki-67 antigen in skull base chordomas: relationships between their expression and prognosis. *Brain Tumor Pathol* **24**, 57–62 (2007).
282. Zhang, C. *et al.* Radioresistance of chordoma cells is associated with the ATM/ATR pathway, in which RAD51 serves as an important downstream effector. *Exp Ther Med* **14**, 2171–2179 (2017).
283. Gröschel, S. *et al.* Defective homologous recombination DNA repair as therapeutic target in advanced chordoma. *Nat Commun* **10**, 1–9 (2019).
284. Li, X. *et al.* Expression of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 in sacral chordomas. *Oncology Letters* **3**, 1268–1274 (2012).
285. Ji, Z. *et al.* Expression of MDR1, HIF-1 α and MRP1 in sacral chordoma and chordoma cell line CM-319. *J Exp Clin Cancer Res* **29**, 1–7 (2010).
286. Aydemir, E. *et al.* Characterization of cancer stem-like cells in

- chordoma: Laboratory investigation. *Journal of Neurosurgery* **116**, 810–820 (2012).
287. Shah, S. R. *et al.* Brachyury-YAP Regulatory Axis Drives Stemness and Growth in Cancer. *Cell Rep* **21**, 495–507 (2017).
288. Fujii, R. *et al.* Enhanced killing of chordoma cells by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity employing the novel anti-PD-L1 antibody avelumab. *Oncotarget* **7**, 33498–33511 (2016).
289. Tuysuz, E. C. *et al.* Distinctive role of dysregulated miRNAs in chordoma cancer stem-like cell maintenance. *Exp Cell Res* **380**, 9–19 (2019).
290. Safari, M. & Khoshnevisan, A. An overview of the role of cancer stem cells in spine tumors with a special focus on chordoma. *World J Stem Cells* **6**, 53–64 (2014).
291. Elming, P. B. *et al.* Hyperthermia: The Optimal Treatment to Overcome Radiation Resistant Hypoxia. *Cancers (Basel)* **11**, (2019).
292. Saeed, A., Singh, P., Malyapa, R. S., Mahmood, J. & Vujaskovic, Z. Hyperthermia Induces Radiosensitization and Leads to Reduced Brachyury Levels in Chordoma Cells. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* **108**, e518 (2020).
293. Singh, P. THE EFFECT OF HYPERTHERMIA AND PROTON RADIATION THERAPY ON CHORDOMA CELLS. (2019).
294. Rodríguez-Zavala, J. S., Calleja, L. F., Moreno-Sánchez, R. & Yoval-Sánchez, B. Role of Aldehyde Dehydrogenases in Physiopathological Processes. *Chem Res Toxicol* **32**, 405–420 (2019).
295. Marchitti, S. A., Brocker, C., Stagos, D. & Vasiliou, V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**, 697–720 (2008).
296. Jackson, B. *et al.* Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics* **5**, 283–303 (2011).
297. Sládek, N. E. Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact. *J Biochem Mol Toxicol* **17**, 7–23 (2003).
298. Luo, Y. *et al.* ALDH1A isozymes are markers of human melanoma stem cells and potential therapeutic targets. *Stem Cells* **30**, 2100–2113 (2012).
299. Patel, M. *et al.* ALDH1A1 and ALDH3A1 expression in lung cancers: correlation with histologic type and potential precursors. *Lung Cancer* **59**, 340–349 (2008).
300. Kardos, G. R., Wastyk, H. C. & Robertson, G. P. Disruption of Proline Synthesis in Melanoma Inhibits Protein Production Mediated by the GCN2 Pathway. *Mol Cancer Res* **13**, 1408–1420 (2015).
301. Tian, X. *et al.* Decreased expression of ALDH5A1 predicts prognosis in patients with ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* **18**, 245–251 (2017).
302. Brocker, C. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) is a novel enzyme involved in cellular defense against hyperosmotic stress. *J Biol Chem* **285**, 18452–18463 (2010).
303. Mu, X. *et al.* Retinal Targets ALDH Positive Cancer Stem Cell and Alters the Phenotype of Highly Metastatic Osteosarcoma Cells. *Sarcoma*

2015, (2015).

304. Greco, N. *et al.* ALDH Activity Correlates with Metastatic Potential in Primary Sarcomas of Bone. *J Cancer Ther* **5**, 331–338 (2014).
305. Zheng, R. *et al.* Expression of ALDH1 and TGF β 2 in benign and malignant breast tumors and their prognostic implications. *Int J Clin Exp Pathol* **7**, 4173–4183 (2014).
306. Marcato, P. *et al.* Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells* **29**, 32–45 (2011).
307. Martinez-Cruzado, L. *et al.* Aldh1 Expression and Activity Increase During Tumor Evolution in Sarcoma Cancer Stem Cell Populations. *Sci Rep* **6**, (2016).
308. Cojoc, M. *et al.* Aldehyde Dehydrogenase Is Regulated by β -Catenin/TCF and Promotes Radioresistance in Prostate Cancer Progenitor Cells. *Cancer Res* **75**, 1482–1494 (2015).
309. Chefetz, I. *et al.* A Pan-ALDH1A Inhibitor Induces Necroptosis in Ovarian Cancer Stem-like Cells. *Cell Rep* **26**, 3061–3075.e6 (2019).
310. Koh, H. K. *et al.* Disulfiram, a Re-positioned Aldehyde Dehydrogenase Inhibitor, Enhances Radiosensitivity of Human Glioblastoma Cells In Vitro. *Cancer Res Treat* **51**, 696–705 (2019).
311. Dinavahi, S. S., Bazewicz, C. G., Gowda, R. & Robertson, G. P. Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors for Cancer Therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* **40**, 774–789 (2019).
312. Calderaro, J. *et al.* ALDH3A1 is overexpressed in a subset of hepatocellular carcinoma characterised by activation of the Wnt/ β -catenin pathway. *Virchows Arch* **464**, 53–60 (2014).
313. Dehghan Harati, M., Rodemann, H. P. & Toulany, M. Nanog Signaling Mediates Radioresistance in ALDH-Positive Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).
314. Dinavahi, S. S., Bazewicz, C. G., Gowda, R. & Robertson, G. P. Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors for Cancer Therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* **40**, 774–789 (2019).
315. Awad, O. *et al.* High ALDH activity identifies chemotherapy-resistant Ewing's sarcoma stem cells that retain sensitivity to EWS-FLI1 inhibition. *PLoS ONE* **5**, e13943 (2010).
316. Ajani, J. A. *et al.* ALDH-1 expression levels predict response or resistance to preoperative chemoradiation in resectable esophageal cancer patients. *Mol Oncol* **8**, 142–149 (2014).
317. Moreb, J. S., Mohuczy, D., Muhoczy, D., Ostmark, B. & Zucali, J. R. RNAi-mediated knockdown of aldehyde dehydrogenase class-1A1 and class-3A1 is specific and reveals that each contributes equally to the resistance against 4-hydroperoxycyclophosphamide. *Cancer Chemother Pharmacol* **59**, 127–136 (2007).
318. Allison, S. E. *et al.* Activation of ALDH1A1 in MDA-MB-468 breast cancer cells that over-express CYP2J2 protects against paclitaxel-dependent cell death mediated by reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol* **143**, 79–89 (2017).
319. Croker, A. K. & Allan, A. L. Inhibition of aldehyde dehydrogenase

- (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44⁺ human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **133**, 75–87 (2012).
320. Yao, T. *et al.* ALDH-1-positive cells exhibited a radioresistant phenotype that was enhanced with hypoxia in cervical cancer. *BMC Cancer* **20**, 891 (2020).
321. Cojoc, M. *et al.* Aldehyde Dehydrogenase Is Regulated by β -Catenin/TCF and Promotes Radioresistance in Prostate Cancer Progenitor Cells. *Cancer Res* **75**, 1482–1494 (2015).
322. Huang, C.-P. *et al.* ALDH-positive lung cancer stem cells confer resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Lett* **328**, 144–151 (2013).
323. Gilabert, M. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) overexpression in human breast cancer stem cells and resistance to olaparib. *PLoS One* **9**, e104302 (2014).
324. Koppaka, V. *et al.* Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. *Pharmacol Rev* **64**, 520–539 (2012).
325. Croker, A. K. & Allan, A. L. Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44⁺ human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **133**, 75–87 (2012).
326. G, F., G, M. & G, Q. α,β -Acetylenic amino thiolester inhibitors of aldehyde dehydrogenases 1&3: suppressors of apoptogenic aldehyde oxidation and activators of apoptosis. *Curr Med Chem* **20**, 527–533 (2013).
327. Venton, G. *et al.* Aldehyde dehydrogenases inhibition eradicates leukemia stem cells while sparing normal progenitors. *Blood Cancer J* **6**, e469 (2016).
328. Rebolledo-Rios, R. *et al.* Dual disruption of aldehyde dehydrogenases 1 and 3 promotes functional changes in the glutathione redox system and enhances chemosensitivity in nonsmall cell lung cancer. *Oncogene* **39**, 2756–2771 (2020).
329. Becht, E. *et al.* Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat Biotechnol* (2018) doi:10.1038/nbt.4314.
330. de Azevedo, J. W. V. *et al.* Biology and pathogenesis of human osteosarcoma. *Oncol Lett* **19**, 1099–1116 (2020).
331. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545–15550 (2005).
332. Hu, W. *et al.* Lymphocyte-Related Inflammation and Immune-Based Scores Predict Prognosis of Chordoma Patients After Radical Resection. *Translational Oncology* **11**, 444–449 (2018).
333. Zou, M.-X. *et al.* Clinical Impact of the Immune Microenvironment in Spinal Chordoma: Immunoscore as an Independent Favorable Prognostic Factor. *Neurosurgery* **84**, E318–E333 (2019).
334. Henderson, S. R. *et al.* A molecular map of mesenchymal tumors.

- Genome Biol* **6**, R76 (2005).
335. CDM, F., JA, B., PCW, H. & F, M. *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*.
336. Cui, J., Dean, D., Hornicek, F. J., Chen, Z. & Duan, Z. The role of extracellular matrix in osteosarcoma progression and metastasis. *J Exp Clin Cancer Res* **39**, 178 (2020).
337. Söderström, M. *et al.* Molecular profiling of human chondrosarcomas for matrix production and cancer markers. *Int J Cancer* **100**, 144–151 (2002).
338. Kao, Y.-C., Lee, J.-C. & Huang, H.-Y. What is new about the molecular genetics in matrix-producing soft tissue tumors? -The contributions to pathogenetic understanding and diagnostic classification. *Virchows Arch* **476**, 121–134 (2020).
339. Trapani, V., Bonaldo, P. & Corallo, D. Role of the ECM in notochord formation, function and disease. *J Cell Sci* **130**, 3203–3211 (2017).
340. Xiao, W., Mohseny, A. B., Hogendoorn, P. C. W. & Cleton-Jansen, A.-M. Mesenchymal stem cell transformation and sarcoma genesis. *Clin Sarcoma Res* **3**, 10 (2013).
341. Ganapathy-Kanniappan, S. & Geschwind, J.-F. H. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. *Mol Cancer* **12**, 152 (2013).
342. Luo, D. *et al.* Clinicopathological and prognostic value of hypoxia-inducible factor-1 α in patients with bone tumor: a systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res* **14**, 56 (2019).
343. Lee, P. *et al.* Targeting glutamine metabolism slows soft tissue sarcoma growth. *Nat Commun* **11**, 498 (2020).
344. Teicher, B. A., Linehan, W. M. & Helman, L. J. Targeting Cancer Metabolism. *Clin Cancer Res* **18**, 5537–5545 (2012).
345. Hamdi, D. H. *et al.* In vitro engineering of human 3D chondrosarcoma: a preclinical model relevant for investigations of radiation quality impact. *BMC Cancer* **15**, 579 (2015).
346. Winkler, J., Abisoye-Ogunniyan, A., Metcalf, K. J. & Werb, Z. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nat Commun* **11**, 5120 (2020).
347. Chen, Y. L. E. *et al.* Predictive Value of FMISO Positron Emission Tomography/Computed Tomography Hypoxic Subvolume for Long-Term Disease Recurrence or Metastases in Mobile Spine and Sacrococcygeal Chordoma. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* **96**, S216–S217 (2016).
348. Kato, T. A. *et al.* In vitro characterization of cells derived from chordoma cell line U-CH1 following treatment with X-rays, heavy ions and chemotherapeutic drugs. *Radiation Oncology* **6**, 116 (2011).
349. Gray, M. *et al.* Development and characterisation of acquired radioresistant breast cancer cell lines. *Radiat Oncol* **14**, 64 (2019).
350. S, Z., A, K., Ms, P. & Mp, X. Formulation, Characterization, and Antitumor Properties of Trans- and Cis-Citral in the 4T1 Breast Cancer Xenograft Mouse Model. *Pharmaceutical research* vol. 32 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25673043/> (2015).

351. Morgan, C. A., Parajuli, B., Buchman, C. D., Dria, K. & Hurley, T. D. N,N-diethylaminobenzaldehyde (DEAB) as a substrate and mechanism-based inhibitor for human ALDH isoenzymes. *Chemico-Biological Interactions* **234**, 18–28 (2015).
352. Quash, G. *et al.* Aldehyde dehydrogenase inhibitors: α,β -Acetylenic N-substituted aminothiolesters are reversible growth inhibitors of normal epithelial but irreversible apoptogens for cancer epithelial cells from human prostate in culture. *European Journal of Medicinal Chemistry* **43**, 906–916 (2008).
353. Rebollido-Rios, R. *et al.* Dual disruption of aldehyde dehydrogenases 1 and 3 promotes functional changes in the glutathione redox system and enhances chemosensitivity in nonsmall cell lung cancer. *Oncogene* **39**, 2756–2771 (2020).
354. Dinavahi, S. S. *et al.* Development of a Novel Multi-Isoform ALDH Inhibitor Effective as an Antimelanoma Agent. *Mol Cancer Ther* **19**, 447–459 (2020).
355. Hao, S. *et al.* Protein phosphatase 2A inhibition enhances radiation sensitivity and reduces tumor growth in chordoma. *Neuro Oncol* **20**, 799–809 (2018).
356. Makarova, K. S. *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* **9**, 467–477 (2011).