



HAL
open science

Caractérisation du microenvironnement tumoral du chondrosarcome : développement d'une approche multimodale innovante afin d'imager son remodelage sous thérapies anti-cancéreuses ciblées

Roxane Autissier

► To cite this version:

Roxane Autissier. Caractérisation du microenvironnement tumoral du chondrosarcome : développement d'une approche multimodale innovante afin d'imager son remodelage sous thérapies anti-cancéreuses ciblées. Cancer. Université Clermont Auvergne, 2022. Français. NNT : 2022UCFAC049 . tel-04028772

HAL Id: tel-04028772

<https://theses.hal.science/tel-04028772>

Submitted on 14 Mar 2023

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.

Thèse présentée à l'Université Clermont Auvergne
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
Spécialité : Biologie Santé

**Caractérisation du microenvironnement tumoral du chondrosarcome :
développement d'une approche multimodale innovante afin d'imager
son remodelage sous thérapies anti-cancéreuses ciblées.**

Présentée et soutenue publiquement par

Roxane AUTISSIER

le 21 octobre 2022

Membres du jury :

Dr. Guillaume DUHAMEL	<i>DR, HDR, CRMBM, Université d'Aix-Marseille</i>	Rapporteur
Pr. Vincent LEBON	<i>PU-PH, HDR, BioMaps, Université Paris-Saclay</i>	Rapporteur
Dr. Aurélie DUTOUR	<i>CR, HDR, CLB, Université Lyon 1</i>	Examinatrice
Pr. Bernard GALLET	<i>PU, LDRI, Université catholique de Louvain</i>	Examineur
Dr. Leslie MAZUEL	<i>IR, IMoST, Université Clermont Auvergne</i>	Encadrante de thèse
Dr. Élisabeth MIOT-NOIRAULT	<i>MCU, HDR, IMoST, Université Clermont Auvergne</i>	Directrice de thèse

Membre invité :

Dr. Guilhem PAGÉS	<i>IR, HDR, QuaPA</i>	Co-directeur de thèse
--------------------------	-----------------------	-----------------------

« C'qui compte c'est pas l'arrivée, c'est la quête... »
Orelsan – La Quête

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance aux deux rapporteurs qui ont accepté de juger mes travaux de thèse, le Dr. Guillaume DUHAMEL et le Pr. Vincent LEBON mais également aux deux examinateurs, le Dr. Aurélie DUTOUR et le Pr. Bernard GALLETZ qui ont accepté de faire partie de ce jury.

Aurélie, je tiens à te remercier particulièrement pour la pédagogie, la patience et la gentillesse dont tu as fait preuve lorsque tu m'as enseigné la chirurgie du modèle SWARM orthotopique sur rat.

Merci également aux Drs. Stéphanie LERONDEL et Julien FLAMENT pour avoir accepté de faire partie de mes 3 comités de suivi de thèse et pour leurs suggestions scientifiques afin d'améliorer la qualité et la pertinence de ces travaux.

Je remercie profondément mes deux directeurs de thèse, les Drs. Élisabeth MIOT-NOIRAUT et Guilhem PAGÉS pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce doctorat sous leur supervision et pour leur disponibilité de chaque instant. Je tiens également à remercier mon encadrante de thèse, le Dr. Leslie MAZUEL, pour son infailible soutien durant ces quatre ans et demi.

Je remercie le Dr. Véronique SANTÉ-LHOUTELLIER pour m'avoir accueillie au sein de l'unité QuaPA et pour tous les moyens mis en œuvre afin que ces recherches se déroulent dans les meilleures conditions.

Je remercie également les Drs. Jean-Marie BONNY et Emmanuel MOREAU ainsi que le Pr. Florent CACHIN, respectivement, les chefs d'équipe d'AgroResonance et des deux équipes d'IMoST (TaToo et RoBust) pour m'avoir poussée à donner le meilleur de moi-même et pour m'avoir aidé à prendre du recul sur mes recherches.

Je remercie Mme Christelle SOUBEYRAND-DAMON pour les formations sur les différents automates de la plateforme Anipath mais aussi pour ses précieux conseils en histologie.

Je sais gré à la radiopharmacie du Centre Jean Perrin pour m'avoir fourni plusieurs radio-isotopes essentiels à ces recherches et particulièrement au Dr. Sophie LEVESQUE pour m'avoir permis de récupérer les fonds de seringues de GlucoTEP. Merci aux Drs. Philippe AUZELOUX et Sébastien SCHMITT pour leur expertise en radiochimie et le marquage de tous les radiotraceurs utilisés dans ces travaux de recherche.

À Mr Erwan BOUTAULT, je suis particulièrement reconnaissante pour son aide précieuse au cours des dernières expérimentations de cette thèse.

Mes remerciements vont également à l'ensemble de mes collègues ainsi que les personnes que j'ai pu côtoyer au cours de ce doctorat au sein de mes deux laboratoires d'accueil, IMoST et AgroResonance. Travailler à vos côtés durant ces quatre ans et demi a été plus qu'enrichissant, autant d'un point de vue professionnel que personnel.

Mes derniers remerciements vont à mes proches ainsi qu'à ma famille. Merci pour l'intérêt que vous avez toujours porté à mon travail, pour votre écoute, pour votre empathie et surtout, pour le soutien inconditionnel que vous m'avez apporté tout au long de cette aventure.

SOUTIENS FINANCIERS

Ce travail de thèse a été financé grâce à une bourse de 3 ans du **Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI)**. Une allocation doctorale de 6 mois de la **Ligue Nationale Contre le Cancer** ainsi qu'une aide individuelle de 6 mois de l'**école doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement** rattachée à l'**Université Clermont Auvergne** ont permis la poursuite de ces travaux de recherche au cours d'une 4^{ème} année de thèse.

Ces expérimentations ont été soutenues financièrement par la **Ligue Régionale Contre le Cancer** à deux reprises avec le projet n°R16146C « Développement d'une méthode d'imagerie innovante contrastant les caractéristiques du microenvironnement du chondrosarcome : diagnostic et suivi de nouvelles prodrogues bispécifiques » et le projet n°R224CC « Voir l'hétérogénéité de l'hypoxie tumorale pour une nouvelle stratification *in vivo* ».



INVESTISSEMENT, TRANSMISSION & VALORISATION

ENGAGEMENTS :

- ❖ Membre du conseil scientifique de l'école doctorale SVSAE
- ❖ Membre du conseil de laboratoire de l'UMR 1240 INSERM / UCA
- ❖ Élu(e) représentante des doctorants auprès de l'école doctorale SVSAE
- ❖ Élu(e) représentante des doctorants et des non-titulaires auprès de l'UMR 1240 INSERM / UCA
- ❖ Membre de la structure du bien-être animal (SBEA) de l'UMR 1240 INSERM / UCA IMoST

ENSEIGNEMENTS :

J'ai dispensé des enseignements trois années sur quatre au cours de mon doctorat :

- ❖ Durant les années universitaires 2018-2019 et 2019-2020, 52 heures de travaux pratiques m'ont été confiées au sein de l'unité d'enseignement de microbiologie de l'UFR de Biologie de l'Université Clermont Auvergne (2^{ème} année de licence).
- ❖ Au cours de l'année 2021-2022, 64 heures de travaux dirigés et pratiques m'ont été attribuées au sein de différentes unités d'enseignement de l'Université Clermont Auvergne :
 - Compétences techniques en diagnostic clinique de l'IUT (Licence professionnelle)
 - Signalétique et pathologie de la reproduction humaine de l'UFR de Biologie (3^{ème} année de licence)
 - Reproduction humaine de l'UFR de Médecine et des professions paramédicales (1^{ère} année de master)
 - Reproduction : AMP de l'UFR de Médecine et des professions paramédicales (3^{ème} année de médecine)

COMMUNICATIONS ORALES :

- ❖ 5^{ème} congrès de la Société Française de Résonance Magnétique en Biologie et en Médecine (SFRMBM) à Lyon (France) du 27 au 29 septembre 2021 « *Benefit of multimodal MRI to follow in vivo tumor microenvironment changes during therapy* », Roxane AUTISSIER, Leslie MAZUEL, Jean-Marie BONNY, Philippe AUZELOUX, Sébastien SCHMITT, Amidou TRAORÉ, Élisabeth MIOT-NOIRAUT & Guilhem PAGÉS.

- ❖ 16th European Molecular Imaging Meeting (EMIM) à Göttingen (Allemagne) du 24 au 27 août 2021 « Tumor microenvironment imaging : multimodality benefit to study chondrosarcoma », Roxane AUTISSIER, Leslie MAZUEL, Élise MAUBERT, Jean-Marie BONNY, Philippe AUZELOUX, Sébastien SCHMITT, Amidou TRAORÉ, Caroline PEYRODE, Élisabeth MIOT-NOIRALT & Guilhem PAGÉS.

- ❖ 23^{ème} journées de l'École doctorale Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement à Clermont-Ferrand (France) du 14 au 15 octobre 2020 « *The interest of combining CEST MRI and nuclear medicine imaging to detect changes in tumor microenvironment : application to chondrosarcoma* », Roxane AUTISSIER, Leslie MAZUEL, Jean-Marie BONNY, Philippe AUZELOUX, Sébastien SCHMITT, Amidou TRAORÉ, Caroline PEYRODE, Élisabeth MIOT-NOIRALT & Guilhem PAGÉS.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES :

- ❖ 3^{ème} journées RMN du Grand Sud (JGS) à Clermont-Ferrand (France) du 1^{er} au 2 juillet 2021, « *Tumor microenvironment imaging : Benefits of multimodality to study chondrosarcoma* », Roxane AUTISSIER, Leslie MAZUEL, Élise MAUBERT, Jean-Marie BONNY, Philippe AUZELOUX, Sébastien SCHMITT, Amidou TRAORÉ, Caroline PEYRODE, Élisabeth MIOT-NOIRALT & Guilhem PAGÉS.

- ❖ 1st Young Researcher in Biology of AURA Region Congress en visioconférence le 17 juin 2021, « *Tumor microenvironment imaging : Benefits of multimodality to study chondrosarcoma* », Roxane AUTISSIER, Leslie MAZUEL, Élise MAUBERT, Jean-Marie BONNY, Philippe AUZELOUX, Sébastien SCHMITT, Amidou TRAORÉ, Caroline PEYRODE, Élisabeth MIOT-NOIRALT & Guilhem PAGÉS.

- ❖ 4^{ème} congrès de la Société Française de Résonance Magnétique en Biologie et en Médecine (SFRMBM) à Strasbourg (France) du 19 au 21 Mars 2019 « *Interest of in vivo CEST MRI to study chondrosarcoma tumour microenvironment* », Roxane AUTISSIER, Élise MAUBERT, Sébastien SCHMITT, Philippe AUZELOUX, Caroline PEYRODE, Françoise DEGOUL, Amidou TRAORÉ, Jean-Marie BONNY, Élisabeth MIOT-NOIRALT, Leslie MAZUEL & Guilhem PAGÉS (**1^{er} prix de communication par affiche**).

PUBLICATIONS :

- ❖ Bimodality imaging as a companion of antitumor efficacy of TH-302 in experimental chondrosarcoma, Roxane AUTISSIER, Guilhem PAGÉS, Erwan BOUTAULT, Jean-Marie BONNY, Sébastien SCHMITT, Philippe AUZELOUX, Aurélie DUTOUR, Élisabeth MIOT-NOIRAUULT & Leslie MAZUEL, *Theranostics* (soon submitted).
- ❖ Simultaneous proteoglycans and hypoxia mapping of chondrosarcoma environment by frequency selective CEST MRI, Roxane AUTISSIER, Leslie MAZUEL, Élise MAUBERT, Jean-Marie BONNY, Philippe AUZELOUX, Sébastien SCHMITT, Amidou TRAORÉ, Caroline PEYRODE, Élisabeth MIOT-NOIRAUULT & Guilhem PAGÉS (2021), *Magnetic resonance in medicine*, 86(2), 1008–1018, <https://doi.org/10.1002/mrm.28781>.

RÉSUMÉ

Le microenvironnement tumoral regroupe différentes composantes très souvent impliquées dans le phénomène de résistance à la thérapie pour de nombreux cancers. Une meilleure caractérisation de ce microenvironnement, à l'aide d'une stratégie d'imagerie moléculaire et fonctionnelle *in vivo*, permettrait une meilleure stratification des patients et donc une prise en charge thérapeutique optimale et personnalisée.

Cette étude a porté sur le microenvironnement tumoral du chondrosarcome, tumeur maligne du cartilage chimio- et radio-résistante, possédant une matrice extracellulaire dense, riche en glycosaminoglycanes (constituants des protéoglycanes), et qui présente des zones d'hypoxie.

La première partie de ce travail de thèse a consisté à développer un contraste en IRM métabolique dépendant de la fréquence spectrale. Il devait être spatialement résolu et non invasif afin de caractériser les deux aspects du microenvironnement tumoral du chondrosarcome SWARM implanté en sous-cutané chez la souris. Le contraste choisi a été celui du transfert de saturation par échange chimique CEST (chemical exchange saturation transfer). Les résultats obtenus en IRM CEST ont été comparés à (i) ceux d'imagerie nucléaire, en [^{99m}Tc]NTP 15-5 et en [¹⁸F]FMISO, permettant de cibler respectivement, les charges négatives des glycosaminoglycanes et l'hypoxie et (ii) ceux obtenus par différentes approches *ex vivo*. Ces méthodes complémentaires d'imageries moléculaires et fonctionnelles *in vivo* ont permis de visualiser le microenvironnement tumoral à un stade défini de la pathologie

La seconde partie de ce travail a été d'évaluer la pertinence de cette stratégie d'imagerie multimodale, pour suivre l'évolution et les remaniements du microenvironnement tumoral d'un chondrosarcome SWARM implanté en orthotopique chez le rat, au cours d'une thérapie anti-cancéreuse ciblée. Une prodrogue activable en hypoxie, le TH-302 (évofosfamide) a été sélectionné. L'approche multimodale, décrite dans le paragraphe précédent, complétée par d'autres analyses, a permis de montrer la pertinence d'une stratégie d'imagerie utilisant plusieurs modalités pour évaluer l'efficacité du TH-302. Une réduction du volume tumoral d'environ 75%, mais aussi des diminutions du métabolisme glucidique et de la fraction hypoxique ont pu être observées, ainsi que des modifications de la matrice extracellulaire au cours de la croissance tumorale.

Mots clés : Chondrosarcome, CEST, Hypoxie, Imagerie multimodale fonctionnelle, Imagerie nucléaire, IRM, Matrice extracellulaire, Microenvironnement tumoral, Prodrogues activables en hypoxie, Protéoglycanes.

ABSTRACT

Tumor microenvironment owns several properties, which are often responsible for therapy resistance in many cancers. A better characterization of these properties, by using an *in vivo* molecular and functional imaging strategy, would offer a better patient stratification and therefore an efficient personalized therapeutic management.

This study was focused on chondrosarcoma microenvironment, the malignant cartilage tumor chemo- and radio-resistant. Chondrosarcoma is characterized by its dense extracellular matrix with a high glycosaminoglycan (proteoglycan component) concentration and presents areas of hypoxia.

The first part of this research was to develop a metabolic MRI contrast frequency-dependent, non-invasive and with a high spatial resolution. We focused on the chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast. CEST MRI is able to characterize both aspects of the tumor microenvironment in a SWARM chondrosarcoma subcutaneously implanted in mice. CEST MRI results were compared to (i) those of nuclear imaging, with [^{99m}Tc]NTP 15-5 and [¹⁸F]FMISO targeting the negative charges of glycosaminoglycans and hypoxia, respectively and (ii) those obtained by different *ex vivo* approaches. These complementary *in vivo* methods allowed visualizing the tumor microenvironment at a given stage of the pathology.

The second part of this work was to evaluate the relevance of this multimodal imaging strategy to monitor evolution and changes in tumor microenvironment of orthotopic SWARM chondrosarcoma model implanted in rats, during a targeted therapy against cancer. A hypoxia-activated prodrug, TH-302 (evofosfamide) was selected. The imaging techniques described earlier as well as complementary ones highlighted the relevance of using multimodal imaging to assess TH-302 effectiveness. A reduction in tumor volume of about 75% but also decreases in glucose metabolism and hypoxic fraction were observed as extracellular matrix modifications during tumor growth.

Keywords : Chondrosarcoma, CEST, Hypoxia, Functional multimodal imaging, Nuclear imaging, MRI, Extracellular matrix, Tumor microenvironment, Hypoxia-activated prodrugs, Proteoglycans.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AACID	Amine and amide concentration independent detection	EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase	FAZA	Fluoroazomycin arabinoside
ADAMTS	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs	FCD	Fixed charge density
ADC	Apparent diffusion coefficient	FDG	Fluoro-2-désoxy-d-glucose
ADN	Acide désoxyribonucléique	FGF	Fibroblast growth factor
Akt	Sérine-thréonine kinase	FGFR	Fibroblast growth factor receptor
ALDOA	Aldolase A	FMISO	Fluoromisonidazole
APT	Amide proton transfer	GAG	Glycosaminoglycane
AQ	Ammonium quaternaire	gagCEST	Glycosaminoglycan chemical exchange saturation transfer
AREX	Apparent exchange-dependent relaxation	GalNac	Galactosamine
ARN	Acide ribonucléique	GAPD	Glycéraldéhyde 3 - phosphate déshydrogénase
ATP	Adénosine triphosphate	GlcA	Acide glucuronique
ATSM	Diacetylbis(4-methylthiosemicarbazonato)	GlcNac	Glucosamine
B_0	Champ magnétique principal	gluCEST	Glutamate chemical exchange saturation transfer
B_1	Champs magnétique radiofréquence	glucoCEST	Glucose chemical exchange saturation transfer
BOLD	Blood oxygenation level dependent	GLUT	Glucose transporter
CA	Carbonic anhydrase	HAP	Hypoxia-activated prodrugs
CAF	Cancer-associated fibroblast	HCO_3^-	Ion bicarbonate
CDK	Cyclin-dependent kinase	HDAC	Histone désacétylase
CEST	Chemical exchange saturation transfer	Hh	Hedgehog
CO_2	Dioxyde de carbone	HIF	Hypoxia inducible factor
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein	HK	Hexokinase
COVID	Coronavirus disease	HMDP	Hydroxyméthylène diphosphonate
CrCEST	Creatine chemical exchange saturation transfer	HRE	Hypoxia responsive element
CTLA	Cytotoxique-T-lymphocyte-antigen	IDH	Isocitrate déshydrogénase
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand	IdoA	Acide iduronique
CXCR	C-X-C motif chemokine receptor	IFN	Interféron
D-2HG	Delta-2-hydroxyglutarate	IGF	Insulin-like growth factor
dGEMRIC	Delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of cartilage	IGF-IR	Insulin-like growth factor 1 receptor
diaCEST	Diamagnetic chemical exchange saturation transfer	IHH	Indian hedgehog
DMSA	Acide dimercaptosuccinique	IL	Interleukines
DNMT	DNA methyltransferase	IMRT	Intensity-modulated radiotherapy
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid	IPM	Isophosphoramidate mustard
DPD	2,3-dicarboxypropane-1,1-diphosphonate	IRM	Imagerie par résonance magnétique
DS	Direct saturation	K^+	Ion potassium
DTPA	Acide diéthylène triamine penta acétique	K_{ex}	Constante d'échange chimique
DZNep	3-Deazaneplanocin A	KO	Knockout
EBRT	External beam radiation therapy	LATEST	Lactate chemical exchange saturation transfer
EGFR	Epidermal growth factor receptor	LD	Lorentzian difference
EMR	Extrapolated semisolid magnetization transfer reference	LDH	Lactate deshydrogénase
ERK	Extracellular signal-regulated kinases	LOX	Lysyl oxydase
ESMO	European society for medical oncology	LRR	Leucine-rich repeat
EXT	Exostosine	M1	Macrophage de type 1
		M2	Macrophage de type 2
		MCT	Monocarboxylate transporter
		MDM	Mouse double minute
		MDP	Méthylène diphosphonate
		MDR	Multi drug resistance
		MDSC	Myeloid-derived suppressor cell

MEK	Mitogen-activated protein ERK kinase	SUV _{max}	Maximum standardized uptake value
microARNs	Micro-acide ribonucléique	SWI	Susceptibility weighted imaging
/miR		T ₁	Temps de relaxation longitudinale
MMP	Matrix metallopeptidases	T ₂	Temps de relaxation transversale
MTC	Magnetization transfer contrast	TAM	Tumor-associated macrophage
MTC _{IM}	Magnetization transfer contrast from immobile semisolid macromolecules	TCA	Tumeur cartilagineuse atypique
MTC _{MM}	Magnetization transfer contrast from macromolecules	TDM	Tomodensitométrie
MT-CYB	Mitochondrially encoded cytochrome B	TEC	Tumor endothelial Cell
mTOR	Mammalian target of rapamycin	TEMP	Tomographie d'émission monophotonique
MTR	Magnetisation transfer ratio	TEP	Tomographie par émission de positons
MTR _{asym}	Asymmetric magnetization transfer ratio	TGF	Transforming growth factor
Na ⁺	Ion sodium	TIL	Tumor-infiltrating lymphocyte
NBC	Sodium bicarbonate co-transporter	TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
NHE	Sodium-hydrogen antiporter	TNF	Tumour necrosis factor
NOTA	1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacetic acid	TNM	Tumor, Node, Metastasis
NTP	N-(triéthylammonium)-3-propyl-[15]ane-N5	UPR	Unfolded protein response
OE	Oxygen-enhanced	V-ATPase	Vacuolar-type ATPase
OMS	Organisation mondiale de la santé	VEGF	Vascular endothelial growth factor
ORL	Oto-rhino-laryngologique	VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
p53	Tumor protein 53	VHL	Von Hippel-Lindau
paraCEST	Paramagnetic chemical exchange saturation transfer	WASABI	Water frequency shift and B ₁ amplitude
PCR	Polymerase chain reaction	WASSR	Water saturation shift referencing
PD	Programmed cell death protein	αCG	α-cétoglutarate
PDGF	Platelet-derived growth factor		
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor		
PDK	Pyruvate déshydrogénase kinase		
PD-L	Programmed death-ligand		
PDX	Patient derived xenografts		
PG	Protéoglycane		
pH	Potentiel hydrogène		
PHD	Prolyl-4-hydroxylase		
pHe	Potentiel hydrogène extracellulaire		
pHi	Potentiel hydrogène intracellulaire		
pHLIP	pH low insertion peptide		
PKM	Pyruvate kinase musculaire		
ppm	Parts per million		
PTHrP	Parathyroid hormone related protein		
QUASS	Quasi-steady-state		
RANKL	Receptor activator of nuclear factor-κB ligand		
Rb	Rétinoblastome		
RECIST	Response evaluation criteria in solid tumors		
RGD	Arginine, glycine et sérine		
RMN	Résonance magnétique nucléaire		
RTK	Récepteur tyrosine kinase		
SDF	Stromal-derived factor		
sGAG	Sulfated glycosaminoglycan		
SLRP	Small leucine-rich proteoglycan		
SRM	Spectroscopie par résonance magnétique		
SRS	Stereotactic radiosurgery		

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Proportions moyennes des sarcomes osseux évaluées dans 43 pays, tout âge confondu,.....	3
Figure 2: Variations des taux d'incidence en fonction de l'âge et du type de sarcome osseux,.....	4
Figure 3: Localisations des chondrosarcomes squelettiques. ^{10,11}	5
Figure 4: Pièces anatomiques de chondrosarcomes : intramédullaire, périphérique, périosté et calcifié.	7
Figure 5: Coupes histologiques de chondrosarcomes conventionnels de différents grades histologiques. ¹⁶	7
Figure 6: Proportions théoriques des différents chondrosarcomes squelettiques	8
Figure 7: Coupes histologiques des différents types de chondrosarcomes non conventionnels ¹⁷	9
Figure 8: Coupes histologiques représentatives de différents grades de chondrosarcome suivies d'une représentation schématique illustrant la détermination du grade de malignité. ¹⁵	11
Figure 9: Présentation simplifiée des voies de signalisations impliquant Rb, p53 et PI3K-Akt-mTOR. 13	
Figure 10: Pourcentages de chaque microARN identifié par séquençage dans des chondrosarcomes conventionnels centraux de grade 1 (GI), 2 (GII) et 3 (GIII). ³⁷	15
Figure 11: Différentes imageries d'un même chondrosarcome de bas grade ¹¹	18
Figure 12: IRM sagittale pondérée en T ₂ d'un chondrosarcome intramédullaire de haut grade. ¹¹	18
Figure 13: Arbre décisionnel pour la prise en charge thérapeutique des chondrosarcomes squelettiques. ¹⁷	20
Figure 14: Radiographie préopératoire d'un chondrosarcome de grade 2	21
Figure 15: Courbes de Kaplan-Meier stratifiées par (a) dose et (b) modalité,	22
Figure 16: Les différents niveaux d'action des 4 classes d'agents chimiothérapeutiques.....	23
Figure 17: Représentation schématique des cellules tumorales et du microenvironnement du chondrosarcome.....	30
Figure 18: Les principales caractéristiques du cancer. ¹⁰⁵	31
Figure 19: Angiogenèse tumorale.....	34
Figure 20: Assemblage du facteur HIF permettant d'activer la transcription de gènes	36
Figure 21: Courbes de Kaplan-Meier représentant la survie des patients atteints de chondrosarcomes	37
Figure 22: Profils d'expression de HIF-1 α en fonction du grade de malignité des chondrosarcomes. ¹⁰⁰	37
Figure 23: L'effet Warburg.....	38
Figure 24: Mécanismes d'acidification du pH extracellulaire en fonction du niveau d'oxygénation ...	40
Figure 25: Organisation macromoléculaire de la matrice extracellulaire.....	42
Figure 26: Niveau d'expression de gènes codants pour différents précurseurs du cartilage.....	44
Figure 27: Structure d'un agrégat de protéoglycanes.	45
Figure 28: Structure détaillée d'un protéoglycane, ici, l'agrécan. ¹⁴⁴	47
Figure 29: Classification des protéoglycanes en fonction de leur localisation. ¹⁴⁵	47
Figure 30: Mise en évidence histologique de l'interaction entre le chondrosarcome et l'os. ¹⁵⁵	51
Figure 31: Principe de l'IRM CEST.	54
Figure 32: Spectres Z schématiques représentant l'effet de la saturation directe de l'eau	56
Figure 33: Approche quantitative de l'effet CEST par la méthode des 3 points. ¹⁷²	57

Figure 34: Fréquences de résonance des différents métabolites ou fonctions visibles par IRM CEST.	59
Figure 35: Mise en évidence des protons échangeables de la chondroïtine sulfate	61
Figure 36: Superposition de cartes gagCEST avec des IRM anatomiques du genou (a)	61
Figure 37: Superposition de cartes de pH obtenues à l'aide des contrastes guanidyles et des amides	62
Figure 38: Superposition de cartes APT CEST sur des images anatomiques de cancer du sein.....	65
Figure 39: Comparaison des voies métaboliques du D-glucose et du [¹⁸ F]FDG.....	68
Figure 40: Comparaison des différents traceurs TEP pour l'étude de l'hypoxie tumorale chez la souris. ³⁰⁵	72
Figure 41: Techniques d'IRM permettant d'évaluer les propriétés de la matrice extracellulaire : représentation de l'intensité du signal IRM en fonction de la concentration en composé. ³²¹	75
Figure 42: Structure chimique du [^{99m} Tc]NTP 15-5.	76
Figure 43: Rat porteur d'un chondrosarcome SWARM implanté en paratibial au niveau de la patte droite et imagé par TEMP/TDM au [^{99m} Tc]NTP 15-5.....	76
Figure 44: Mécanismes d'actions des inhibiteurs de HIF agissant à différents niveaux.....	79
Figure 45: Métabolisme du TH-302. ³⁷²	83

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Différentes structures de glycosaminoglycanes mettant en évidence les charges négatives portées par les unités di-saccharidiques qui les composent.	46
--	----

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	3
SOUTIENS FINANCIERS	5
INVESTISSEMENT, TRANSMISSION & VALORISATION	7
RÉSUMÉ	11
ABSTRACT	13
LISTE DES ABRÉVIATIONS	15
LISTE DES FIGURES.....	17
LISTE DES TABLEAUX.....	18
Chapitre 1 : Contexte des travaux & préambule.....	1
Chapitre 2 : Introduction bibliographique	3
I) Le chondrosarcome.....	3
A) Présentation du chondrosarcome.....	3
B) Différentes classifications du chondrosarcome	5
1) Classification selon les modalités d'apparition	5
2) Classification selon la localisation	6
3) Classification selon l'analyse anatomopathologique	7
<i>i. Chondrosarcomes à cellules claires</i>	<i>8</i>
<i>ii. Chondrosarcomes mésenchymateux.....</i>	<i>8</i>
<i>iii. Chondrosarcomes dédifférenciés</i>	<i>9</i>
4) Classification des chondrosarcomes conventionnels selon le grade histologique de Evans	9
<i>i. Grade 1.....</i>	<i>10</i>
<i>ii. Grade 2.....</i>	<i>10</i>
<i>iii. Grade 3.....</i>	<i>10</i>
C) Étiologie du chondrosarcome	11
1) Mutations géniques précoces donnant lieu à des tumeurs.....	12
<i>i. IDH1/IDH2</i>	<i>12</i>
<i>ii. EXT1/EXT2</i>	<i>12</i>
<i>iii. IHH/PTHrP</i>	<i>12</i>
2) Modifications géniques tardives donnant lieu à des tumeurs malignes	13
<i>i. Rb et p53</i>	<i>13</i>
<i>ii. PI3K-Akt-mTOR.....</i>	<i>13</i>
3) Mécanismes induisant ces modifications géniques.....	14
<i>i. Anomalies chromosomiques</i>	<i>14</i>
<i>ii. Epigénétique : hyperméthylations de l'ADN et modifications d'histones.....</i>	<i>14</i>
<i>iii. microARNs.....</i>	<i>15</i>
D) Diagnostic du chondrosarcome	16
1) Symptômes	16
2) Recommandations	16
<i>i. Imageries anatomiques conventionnelles retrouvées en clinique</i>	<i>16</i>
<i>ii. Prélèvements.....</i>	<i>19</i>
3) Diagnostic différentiel.....	19
4) Facteurs pronostiques	19

E) Prise en charge thérapeutique du chondrosarcome	20
1) Chirurgie	20
2) Radiothérapie	22
3) Chimiothérapie	23
<i>i. Chimiothérapies conventionnelles</i>	23
<i>ii. Nouvelles chimiothérapies ciblées</i>	25
<i>iii. Chimiorésistance</i>	29
II) Le chondrosarcome et son microenvironnement tumoral	29
A) Composante cellulaire	30
1) Cellules tumorales	30
2) Cellules fibroblastiques.....	31
3) Cellules immunitaires	31
<i>i. Macrophages</i>	31
<i>ii. Lymphocytes</i>	32
<i>iii. Cellules dendritiques (CD11c+, CD83+, CD123+)</i>	33
B) Composante vasculaire	34
1) Angiogenèse tumorale.....	34
2) Hypoxie	35
3) Facteurs HIFs.....	35
<i>i. Présentation</i>	35
4) Rôles des facteurs HIFs dans la reprogrammation du métabolisme énergétique du chondrosarcome.....	38
<i>i. Modulation de la glycolyse : l'effet Warburg</i>	38
<i>ii. Acidification du microenvironnement tumoral</i>	39
<i>iii. Invasion cellulaire et dissémination métastatique</i>	41
<i>iv. Angiogenèse tumorale</i>	41
C) Composante matricielle	42
1) Protéines fibrillaires : élastine et collagène	43
2) Protéines de structure	44
3) Protéoglycanes	45
<i>i. Structure</i>	45
<i>ii. Classification et rôles des protéoglycanes</i>	47
4) Enzymes	49
D) Interactions entre le chondrosarcome et l'os	50
III) Les stratégies d'imagerie diagnostique et les approches thérapeutiques exploitant le microenvironnement tumoral	52
A) Présentations des imageries fonctionnelles	52
1) Imagerie nucléaire	52
2) IRM CEST.....	53
<i>i. Principe de l'IRM CEST</i>	53
<i>ii. Facteurs pouvant influencer l'effet CEST</i>	54
<i>iii. Quantification du contraste CEST</i>	55
<i>iv. Fonctions d'intérêt étudiées par l'IRM CEST pour l'oncologie clinique</i>	59
B) Imageries fonctionnelles de la tumeur et de son microenvironnement	66
1) Imagerie <i>in vivo</i> de la prolifération cellulaire et du métabolisme tumoral.....	66

2) Imagerie <i>in vivo</i> ciblant les acteurs de l'immunité tumorale.....	68
3) Imagerie <i>in vivo</i> de l'angiogenèse.....	69
4) Imagerie <i>in vivo</i> de l'hypoxie et du pH.....	70
5) Imagerie <i>in vivo</i> des composants de la matrice extracellulaire	74
6) Imagerie <i>in vivo</i> du remodelage osseux.....	77
C) Stratégies thérapeutiques ciblant le microenvironnement tumoral	77
1) Ciblage des acteurs de l'immunité anti-tumorale.....	77
2) Ciblage de l'angiogenèse	78
3) Ciblage de l'hypoxie	79
i. <i>Inhibition du facteur de transcription HIF</i>	79
ii. <i>Inhibition de l'anhydrase carbonique IX</i>	81
iii. <i>Activation de prodrogues grâce à l'hypoxie</i>	81
4) Ciblage des composants de la matrice extracellulaire.....	84
5) Ciblage du remodelage osseux	86
IV) Objectifs du travail de thèse.....	87
Chapitre 3 : Travail expérimental	88
I) Présentation de l'article « Simultaneous proteoglycans and hypoxia mapping of chondrosarcoma environment by frequency selective CEST MRI”	88
A) Contexte et objectifs de l'étude.....	88
B) Méthodes.....	89
C) Principaux résultats.....	89
D) Principales conclusions.....	90
II) Présentation de l'article « Bimodality imaging as a companion of antitumor efficacy of TH-302 in experimental chondrosarcoma ».....	107
A) Contexte et objectifs de l'étude.....	107
B) Méthodes.....	107
C) Principaux résultats.....	108
D) Principales conclusions.....	109
Chapitre 4 : Discussion générale	138
Chapitre 5 : Conclusion générale.....	143
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	145

Chapitre 1 : Contexte des travaux & préambule

Dans le domaine de la médecine personnalisée en oncologie, l'analyse de la littérature a fait émerger l'importance de la prise en compte de l'interaction des cellules tumorales avec leur microenvironnement.¹ Une meilleure caractérisation de ce microenvironnement est donc une étape cruciale dans la lutte contre le cancer.² Parmi les multiples composants du microenvironnement tumoral, la matrice extracellulaire, la vascularisation, l'hypoxie ou encore l'infiltration immunitaire apparaissent comme les éléments clés de la progression tumorale, de la dissémination métastatique et de la résistance à la thérapie. Elles pourraient ainsi devenir des biomarqueurs pronostiques mais également des cibles pertinentes en thérapie.

Dans ce contexte thérapeutique visant à proposer au patient la prise en charge la plus adaptée à la pathologie tumorale qu'il présente, le recours aux stratégies d'imageries moléculaires *in vivo* connaît un essor considérable.

Ce travail de thèse s'intègre dans la thématique de recherche « ciblage de la matrice extracellulaire et du microenvironnement tumoral », de l'[UMR 1240 IMoST INSERM/UCA](#). Elle est également au centre d'une collaboration fructueuse entre deux structures, le laboratoire IMoST et l'équipe [AgroResonance](#), équipe spécialisée dans la recherche en IRM, de l'UR 370 QuaPA INRAE, dont les travaux collaboratifs ont été soutenus à deux reprises par la Ligue Régionale contre le cancer Auvergne Rhône-Alpes. Ce projet de recherche fait partie intégrante de la plateforme d'imagerie « *In Vivo Imaging Auvergne* » ([IVIA](#)) regroupant toutes les techniques d'imageries médicales. Pour mener à bien ces travaux, j'ai rédigé des saisines pour les expérimentations précliniques *in vivo* présentées dans ce manuscrit. Ces expérimentations ont été autorisées par le MESRI sous les numéros #15991 et #20398. Une partie de ces recherches a porté sur un modèle de chondrosarcome SWARM implanté en position paratibiale chez le rat, modèle qui a pu être mis en place au sein du laboratoire IMoST grâce à l'aide précieuse du Dr. Aurélie DUTOUR (UMR 5286 CNRS et UMR 1052 INSERM, Centre Léon Bérard, CRCL, Université Claude Bernard Lyon 1). Ces échanges fructueux ont notamment permis de relancer ce projet à la suite des deux confinements dus à la COVID-19.

Ce manuscrit est rédigé sur articles et comporte au total 5 chapitres :

- Le premier, celui que vous êtes en train de lire, comporte le contexte des travaux ainsi que le préambule.
- Le second est l'introduction bibliographique comprenant un état de l'art sur la pathologie du chondrosarcome et plus spécifiquement sur les chondrosarcomes squelettiques, leurs interactions avec le microenvironnement tumoral. Il aborde les approches diagnostiques et thérapeutiques associées, transposables ou transposées, en recherche clinique.
- Le troisième chapitre porte sur la partie expérimentale avec la présentation de chacun des deux articles scientifiques et les articles eux-mêmes.
- Le quatrième chapitre est une discussion générale comprenant le bilan du travail réalisé, les limites auxquelles nous avons été confrontés mais également certaines perspectives.
- Le cinquième et dernier chapitre clôture ce manuscrit de thèse sur une conclusion générale.

Chapitre 2 : Introduction bibliographique

I) Le chondrosarcome

A) Présentation du chondrosarcome

Les sarcomes osseux sont un groupe de tumeurs malignes rares puisqu'ils représentent seulement 0,2% de tous les cancers humains ; ils se développent au niveau du squelette et des articulations.³ Il en existe une vingtaine de types selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) mais les trois tumeurs les plus fréquentes sont l'ostéosarcome, le sarcome d'Ewing et le chondrosarcome.⁴

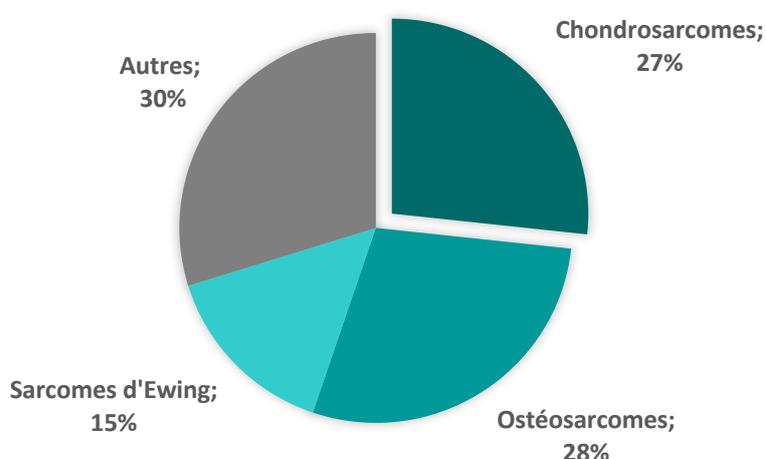


Figure 1: Proportions moyennes des sarcomes osseux évalués dans 43 pays, tout âge confondu, entre 2003 et 2007.⁵

La plus représentée est la tumeur maligne de l'os, l'ostéosarcome, avec une incidence moyenne annuelle en Europe de 0,3 cas pour 100 000 correspondant à 28,5% des sarcomes osseux (Figure 1 & Figure 2).⁵ L'ostéosarcome touche principalement les adolescents entre 15 et 19 ans avec un sexe ratio homme/femme de 1,4 :1.⁴ Ce cancer, considéré comme agressif, se développe généralement au niveau des os longs mais il peut également être retrouvé au niveau des os plats.

Le sarcome d'Ewing, quant à lui, possède une incidence annuelle moyenne en Europe de 0,2 cas pour 100 000 et représente 15% des sarcomes osseux (Figure 1 & Figure 2).⁵ Il touche majoritairement les enfants et les adolescents de sexe masculin (sexe ratio de 1,5 :1) avec un âge moyen de diagnostic à 15 ans.⁴ Dans la moitié des cas, son développement a lieu au niveau des extrémités des os longs. Ce cancer peut aussi toucher les os plats comme les côtes, les os constituant le pelvis, mais également les vertèbres.⁴

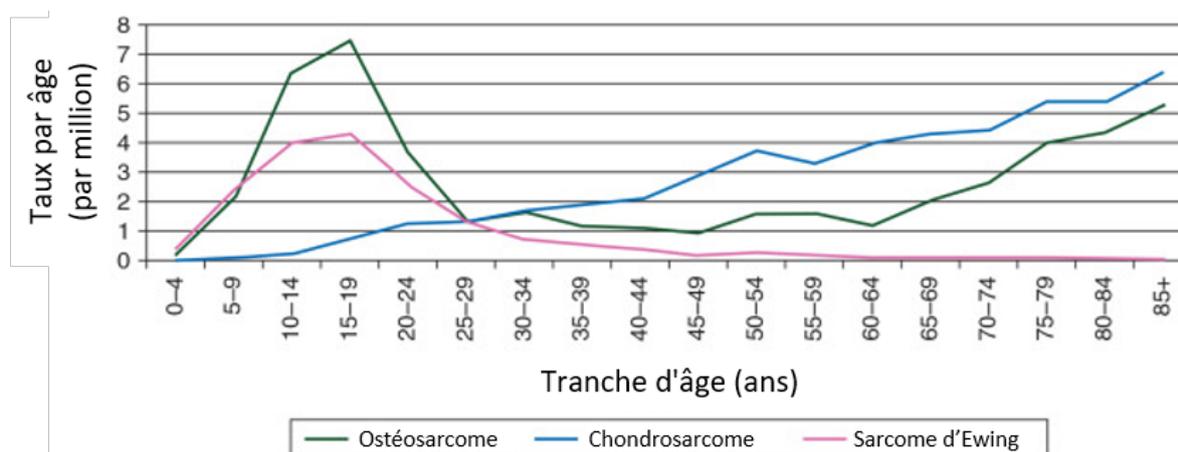


Figure 2: Variations des taux d'incidence en fonction de l'âge et du type de sarcome osseux, mesurées en Angleterre entre 1998 et 2007.⁶

Enfin, le chondrosarcome, tumeur maligne du cartilage, et objet de ce travail de thèse, représente 26,7% des sarcomes osseux (Figure 1).⁵ Pendant longtemps, les chondrosarcomes ont fait partie de la catégorie générale des sarcomes ostéogéniques, tels que l'ostéosarcome. L'un des premiers à avoir souligné la nécessité d'une distinction entre les tumeurs chondrogéniques et ostéogéniques a été le docteur Dallas Burton Phemister en 1930. C'est seulement 13 ans plus tard, grâce aux travaux de deux docteurs en médecine newyorkais, Louis Lichtenstein et Henry L. Jaffe, que l'« American College of Surgeons » accepte de modifier la première classification des tumeurs osseuses et de considérer les chondrosarcomes comme des lésions distinctes des sarcomes ostéogéniques.⁷

Actuellement, l'incidence annuelle moyenne des chondrosarcomes en Europe est de 0,2 cas pour 100 000 mais, malgré sa faible incidence, le chondrosarcome reste le plus fréquent des sarcomes osseux chez l'adulte (Figure 2).^{4,5} La majorité des diagnostics est effectuée entre 30 et 60 ans et chaque année en France, une centaine de nouveaux cas est recensée.⁴ Concernant la prédominance de genres, plusieurs études récentes affirment que le chondrosarcome peut toucher autant les hommes que les femmes.^{4,5}

Le taux moyen de survie à 5 ans est de 75,2% selon une étude utilisant les données de l'American College of Surgeons collectées entre 1985 et 2003, sur 9606 cas de chondrosarcomes étudiés.⁸ Néanmoins, une méta-analyse a permis de mettre en évidence l'importante variation des taux de survie selon le grade de malignité ou encore le sous-type histologique étudié. En effet, une absence de survie à des taux de survie de 99% sont renseignés selon les études.⁹

Les chondrosarcomes squelettiques peuvent se développer aussi bien au niveau des os plats que des os longs. Les localisations primaires des chondrosarcomes squelettiques se situent préférentiellement au niveau des os du pelvis (22,1%), du fémur (proximal : 9,8% et distal : 6,9%), de la colonne vertébrale (10,5%) et de l'humérus proximal (9,5%). De manière moins fréquente, ils

peuvent également se développer au niveau du tibia, des côtes ou encore des omoplates (Figure 3).¹⁰ Dans de rares cas, les chondrosarcomes squelettiques peuvent toucher le sternum, le crâne ainsi que les pieds et les mains. Certaines localisations telles que le crâne, la colonne ou encore le bassin rendent la prise en charge thérapeutique du chondrosarcome plus complexe.

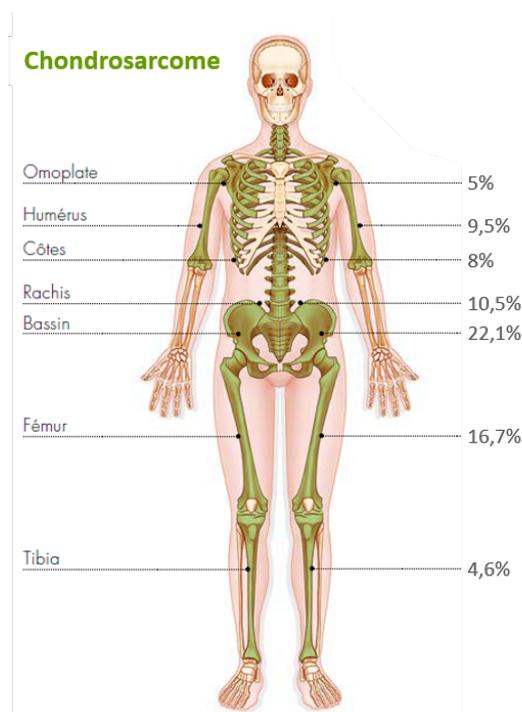


Figure 3: Localisations des chondrosarcomes squelettiques.^{10,11}

Plusieurs classifications ont été établies afin de catégoriser l'ensemble des chondrosarcomes.

B) Différentes classifications du chondrosarcome

Les chondrosarcomes peuvent être classés suivant différents critères tels que leur modalité d'apparition, leur localisation, leur aspect anatomopathologique, leur grade tumoral ou encore leur stade tumoral. Le stade tumoral est identifié grâce au système TNM (Tumor, Node, Metastasis) développé par l'Union internationale contre le cancer pour la classification des tumeurs cancéreuses solides.

1) Classification selon les modalités d'apparition

La première caractéristique permettant de classer un chondrosarcome est de déterminer si ce dernier est primaire ou bien secondaire. Dans le premier cas, son développement est spontané sans atteinte préalable du tissu alors que dans le second cas, le chondrosarcome se développe à partir d'une fracture ou d'une tumeur bénigne du cartilage préexistante. Les deux types de tumeurs bénignes les

plus fréquentes et pouvant être à l'origine du développement d'un chondrosarcome sont les enchondromes et les ostéenchondromes.¹²

Les **enchondromes** se développent au centre de l'os, dans la cavité médullaire au niveau de la métaphyse et se caractérisent par la formation d'un cartilage hyalin mature. Les enchondromes sont généralement uniques mais certains patients peuvent présenter des enchondromes multiples, autrement nommés enchondromatose. L'enchondromatose provoque la maladie d'Ollier ou si elle est associée à des angiomes (agglomération de vaisseaux sanguins), elle provoque le syndrome de Maffucci. De manière générale, les enchondromes ou l'enchondromatose sont localisés préférentiellement au niveau des extrémités distales des membres. Avec la maladie d'Ollier, le risque de transformation en chondrosarcome secondaire peut atteindre 30 à 50% et ce risque peut doubler en cas de syndrome de Maffucci.

Les **ostéenchondromes** sont des tumeurs osseuses et cartilagineuses bénignes se développant à la surface de la partie métaphysaire des os longs suite à une ou plusieurs lésions. Dans le cas de lésions osseuses multiples, nous parlerons d'ostéenchondromes multiples ou d'ostéenchondromatose. Le risque de développer un chondrosarcome secondaire suite à l'apparition d'un ostéenchondrome solitaire est seulement de 1% alors qu'avec un ostéenchondromatose, le risque peut augmenter jusqu'à 27%.

2) Classification selon la localisation

Le chondrosarcome prendra sa dénomination en fonction de sa localisation au niveau du tissu osseux.

Nous distinguerons alors les chondrosarcomes :

- **Centraux ou intra médullaires** qui se développent à l'intérieur de la cavité médullaire des os longs. Ils représentent approximativement 85% des chondrosarcomes osseux (Figure 4).¹³
- **Périphériques (>15%)** qui se développent à la surface de l'os compact. Ils sont souvent dus à des transformations malignes de tumeurs bénignes préexistantes, de type ostéenchondrome, touchant majoritairement la coiffe cartilagineuse (Figure 4).¹³
- **Justacorticaux ou périostés (<1%)** qui apparaissent à la surface des os au niveau du périoste (Figure 4).⁸

Macroscopiquement parlant, ces chondrosarcomes osseux sont souvent de larges tumeurs (> 4 cm) lobulaires. Les lobules sont séparés par des septa et sont translucides de couleur bleu-gris ou blancs indiquant la présence de cartilage hyalin (Figure 4). De la même façon, des zones jaunâtres sont régulièrement retrouvées et sont associées à des dépôts de calcium, autrement dit à des zones de minéralisation dans la tumeur (Figure 4).¹⁴

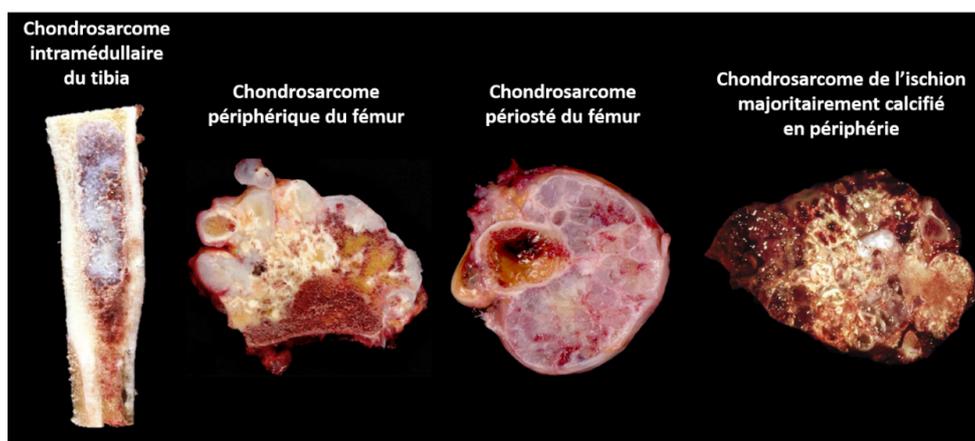


Figure 4: Pièces anatomiques de chondrosarcomes : intramédullaire, périphérique, périosté et calcifié.

3) Classification selon l'analyse anatomopathologique

C'est à partir de l'analyse anatomopathologique qu'est effectuée la détermination du grade et le caractère conventionnel ou non d'un chondrosarcome. Un chondrosarcome conventionnel présente des lobules de cartilage hyalin avec des degrés variables de cellularité. Les chondrocytes sont atypiques et présentent un polymorphisme avec des noyaux généralement hypertrophiés et binucléés. La matrice extracellulaire des chondrosarcomes conventionnels est de type chondroïde hyaline et/ou myxoïde (Figure 5).¹⁵

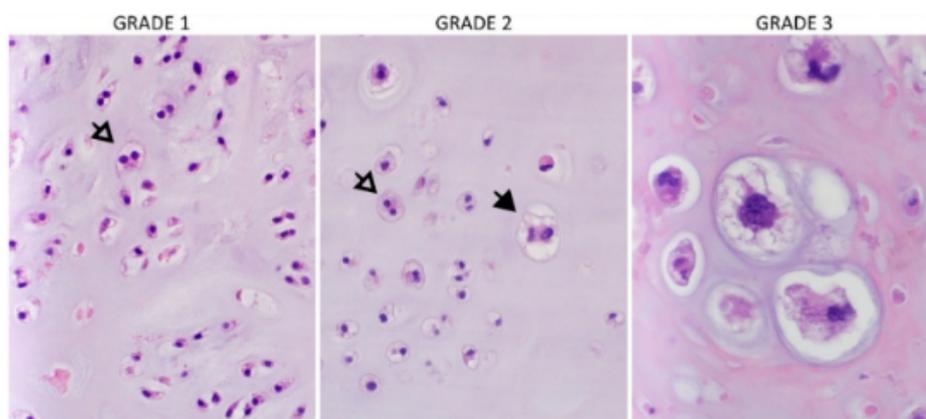


Figure 5: Coupes histologiques de chondrosarcomes conventionnels de différents grades histologiques.¹⁶

Coloration à l'hématoxyline et éosine ; grossissement : x200 (grades 1 et 2) et x600 (grade 3). Des atypies cytologiques et nucléaires sont observées ainsi que l'évolution des matrices chondroïdes hyalines (grade 1) à des matrices myxoïdes (grade 3). Les flèches blanches représentent des binucléations de chondrocytes et la flèche noire, un important chondrocyte très atypique.

Les chondrosarcomes squelettiques décrits ci-dessus sont dans 85% des cas, des chondrosarcomes conventionnels. Les 15% des chondrosarcomes squelettiques restants représentent des sous-types plus rares : les chondrosarcomes non conventionnels (Figure 6).

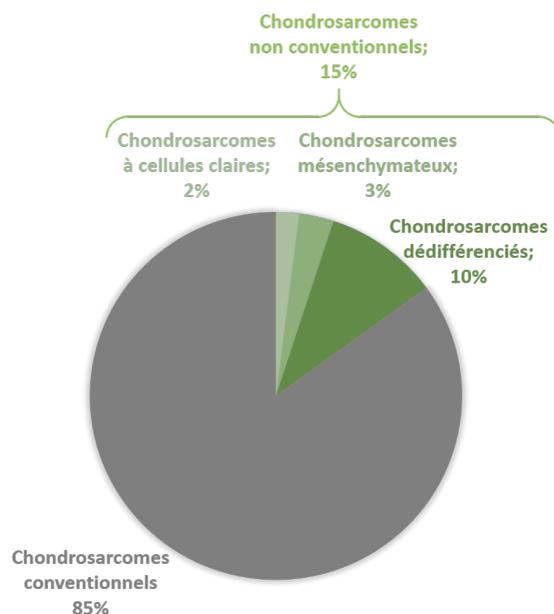


Figure 6: Proportions théoriques des différents chondrosarcomes squelettiques regroupant les conventionnels et les non-conventionnels.

Trois types sont actuellement recensés :

i. Chondrosarcomes à cellules claires

Les chondrosarcomes à cellules claires sont en général de faible grade et représentent 2% de l'ensemble des chondrosarcomes squelettiques primaires. Ces tumeurs sont composées de chondrocytes tumoraux hypertrophiques « osteoclast-like » claires avec un cytoplasme vide et une matrice extracellulaire chondroïde hyaline (Figure 7A).¹⁷ La majorité des patients diagnostiqués est âgée de 25 à 50 ans avec un sex-ratio de 3,82 :1. Le taux de survie à 5 ans est de 62,3% avec un faible taux métastatique de 5,7%.¹⁸

ii. Chondrosarcomes mésoenchymateux

Les chondrosarcomes mésoenchymateux représentent entre 3% à 10% des chondrosarcomes squelettiques primaires selon les études. Ils sont associés à un haut grade puisque ces tumeurs sont à la fois composées de petites cellules rondes indifférenciées et d'îlots de cartilage hyalin différenciés, sans démarcation entre ces régions histologiques (Figure 7B).¹⁹ Ce type de cancer atteint majoritairement des patients âgés de 20 à 30 ans avec un sex-ratio de 1,19 :1. Le taux de survie à 5 ans est de 37,6% pour les chondrosarcomes mésoenchymateux et dans 10,6% des cas, ces derniers présentent une évolution métastatique avec comme sites préférentiels les poumons, les os et les ganglions.^{15,18}

iii. Chondrosarcomes dédifférenciés

Les chondrosarcomes dédifférenciés sont associés à un haut grade de malignité et représentent environ 10% de tous les chondrosarcomes. Ce sous-type se singularise des précédents puisqu'il est composé de deux entités distinctes. La première est assimilable à un type tumoral dont la matrice extracellulaire est cartilagineuse et différenciée de faible grade alors que la seconde a un aspect non cartilagineux et de haut grade de malignité comme c'est le cas pour l'ostéosarcome. Sur coupe histologique, ces deux composantes tissulaires ne se chevauchent pas et la démarcation de l'une par rapport à l'autre est abrupte (Figure 7C).^{17,19} L'âge médian de survenue des chondrosarcomes dédifférenciés est de 55 ans avec un sex-ratio de 1,18 :1 et un taux de survie à 5 ans de 11,3%. Le risque d'évolution métastatique, au niveau des poumons et des os, est le plus important pour ce type de chondrosarcome non conventionnel avec un taux de 19,8%.^{15,18}

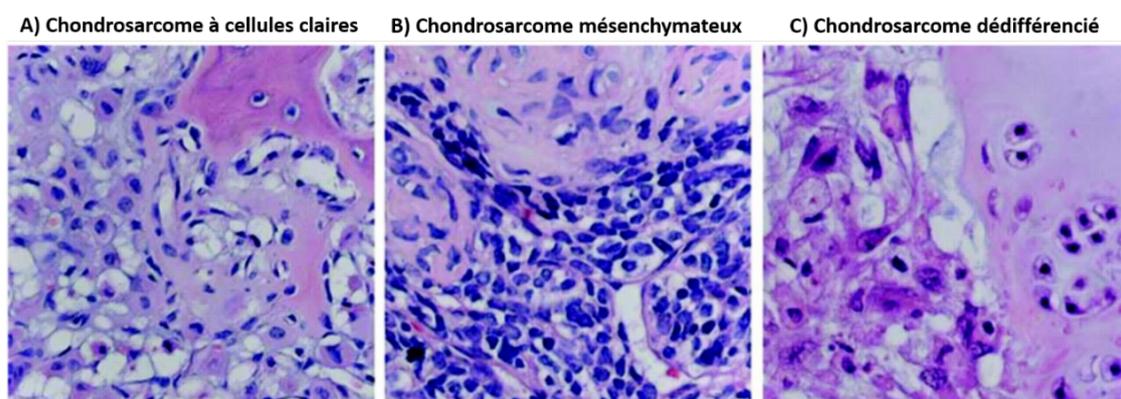


Figure 7: Coupes histologiques des différents types de chondrosarcomes non conventionnels¹⁷

Coloration à l'hématoxyline et éosine ; grossissement : x500. (A) Chondrosarcome à cellules claires montrant des chondrocytes clairs avec un cytoplasme abondant et une matrice chondroïde hyaline. (B) Chondrosarcome mésenchymateux avec des petites cellules rondes bleues indifférenciées (en bas) et un îlot de cartilage hyalin différencié (en haut). (C) Chondrosarcome dédifférencié avec une interface nette entre la partie non cartilagineuse (à gauche) et la partie cartilagineuse différenciée (à droite).

Dans la mesure où ce travail de thèse est focalisé sur les chondrosarcomes squelettiques dits conventionnels, la suite de ce manuscrit s'intéressera uniquement à ce type de tumeurs.

4) Classification des chondrosarcomes conventionnels selon le grade histologique de Evans

Louis Lichtenstein et Henry L. Jaffe décrivent, en 1943, les premières caractéristiques histologiques des chondrosarcomes. Ils s'intéressèrent à la fois au nombre de noyaux retrouvés dans les cellules tumorales mais aussi à leur taille et leur forme.⁷ En 1977, le Docteur Harry L. Evans et ses collaborateurs mirent au point une méthode permettant de grader histologiquement un

chondrosarcome afin de lui associer par la suite, un potentiel métastatique, et une valeur pronostique.²⁰ Ainsi naissait la classification d'Evans. Cette dernière est divisée en 3 grades histologiques, du plus bénin (grade 1) au plus malin (grade 3), basés sur la taille des noyaux des cellules cancéreuses, la cellularité et le type de matrice extracellulaire (Figure 8).

i. Grade 1

Un chondrosarcome de grade 1 présente une matrice extracellulaire de type chondroïde hyaline, abondante et une cellularité faible à modérée associée à un indice mitotique faible.^{19,20} Les noyaux des cellules de chondrosarcome de grade 1 sont ronds, hyper chromatiques et de tailles uniformes. Ces tumeurs sont de bon pronostic puisque les taux de survie des patients à 5 et 10 ans sont respectivement de 90% et 83% et leur potentiel métastatique est nul.²⁰ C'est d'ailleurs pour cette raison que depuis 2013, elles sont classées par l'OMS dans la catégorie des tumeurs cartilagineuses atypiques (TCA).⁴ Une nouvelle précision a été apportée par cette même organisation en 2020, en indiquant que la catégorie des TCA devait être utilisée pour les tumeurs apparaissant dans les os longs et tubulaires du squelette appendiculaire, tandis que les tumeurs situées au niveau du squelette axial comprenant le bassin, les omoplates et la base du crâne doivent être appelées chondrosarcomes de grade 1.²¹

ii. Grade 2

Un chondrosarcome conventionnel de grade 2 possède une matrice extracellulaire plus myxoïde que chondroïde et une cellularité augmentée. L'indice mitotique augmente légèrement par rapport au grade 1 même s'il reste faible.^{15,22} Les noyaux cellulaires deviennent atypiques, de tailles plus importantes et sont toujours hyper chromatiques. Les taux de survie à 5 et 10 ans sont de 81% et 64%, respectivement, associés à un potentiel métastatique pulmonaire de 10%.²⁰

iii. Grade 3

Un chondrosarcome conventionnel de grade 3 ou de haut grade est caractérisé par une matrice extracellulaire principalement myxoïde et/ou muco-myxoïde. La cellularité ainsi que l'indice mitotique sont élevés. Les cellules cancéreuses sont de plus grandes tailles mais celles présentes en périphérie de lobule sont fusiformes et moins différenciées que les cellules du centre.²² Leurs noyaux sont hyper chromatiques, atypiques et, eux aussi, de taille augmentée. Des zones nécrotiques peuvent être présentes au sein du tissu tumoral.¹⁵ Les taux de survie à 5 et 10 ans sont de 43% et 29%, respectivement. Le potentiel métastatique pulmonaire des chondrosarcomes conventionnels de grade 3 atteint les 71%.²⁰

La majorité des chondrosarcomes primaires conventionnels sont de faibles grades de malignité (1 ou 2). Les travaux menés par Nota *et al.*, regroupant 13 études comportant au total 1114 patients atteints de chondrosarcomes conventionnels centraux, montrent qu'en moyenne 21% des patients sont atteints de chondrosarcomes de grade 3.⁹ Cependant, il est important de mentionner qu'au sein d'une même tumeur, plusieurs grades peuvent coexister et que dans environ 10% des cas de récurrence, le chondrosarcome augmente de grade de malignité.²³

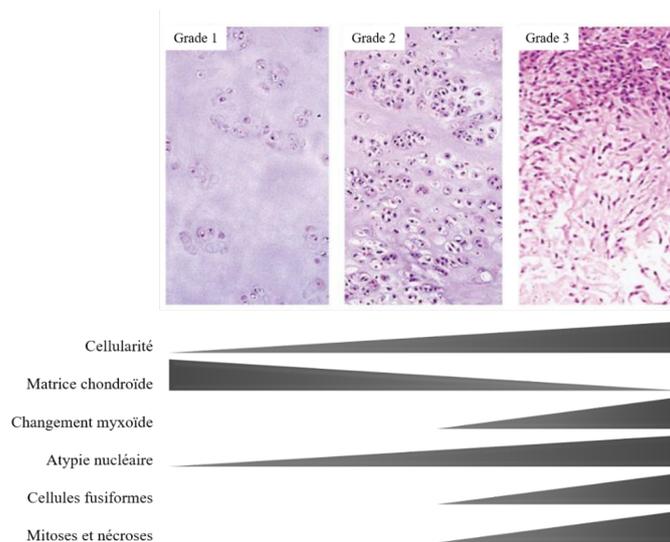


Figure 8: Coupes histologiques représentatives de différents grades de chondrosarcome suivies d'une représentation schématique illustrant la détermination du grade de malignité.¹⁵

Après avoir introduit la pathologie du chondrosarcome, au travers de son impact chiffré sur la population, sa description anatomique et ses différentes classifications, il est important d'aborder maintenant les principaux mécanismes impliqués dans son développement.

C) Étiologie du chondrosarcome

Même si les chondrosarcomes se développent au niveau des cartilages articulaires, il existe toutefois des localisations cartilagineuses préférentielles reliées aux os plats comme la scapula, les côtes ou les os du pelvis mais aussi aux os longs (humérus, fémur, tibia) ou encore aux os composant le rachis vertébral.²⁴

Les causes de survenue de ce cancer ne sont actuellement pas toutes identifiées mais l'implication de certaines voies de signalisations cellulaires a été mise en évidence. En effet, des mutations peuvent apparaître de manière précoce en entraînant la formation de tumeurs bénignes de types enchondromes ou ostéochondromes, par exemple, au cours de l'ossification enchondrale. Ces mutations peuvent survenir de manière plus tardive, en favorisant la transition d'une tumeur bénigne à une tumeur maligne dans le cas d'un chondrosarcome secondaire ou directement, avec l'apparition sporadique d'un chondrosarcome primaire.

1) Mutations géniques précoces donnant lieu à des tumeurs

i. IDH1/IDH2

Une des modifications géniques prédominantes, pouvant entraîner l'apparition de tumeurs cartilagineuses et osseuses bénignes et malignes, est celle qui touche les gènes codant pour les isocitrates déshydrogénases 1 et 2, respectivement, IDH1 et IDH2. En effet, ce type de mutations a été identifié dans les chondrosarcomes primaires et secondaires centraux à hauteur, respectivement, de 70% et 86%.²⁵

IDH1 et IDH2 sont des enzymes du cycle de Krebs catalysant la décarboxylation oxydative de l'isocitrate pour produire de l' α -cétoglutarate (α CG). Lorsque les gènes IDH sont mutés, les enzymes perdent leur capacité à convertir l'isocitrate en α CG entraînant l'accumulation de delta-2-hydroxyglutarate (D-2HG). Le D-2HG est considéré comme un oncométabolite favorisant la tumorigenèse.

De plus, une analyse génomique de type « whole-exome sequencing » a été réalisée sur 49 cas de chondrosarcomes par une équipe de Cambridge en 2013 et a permis de confirmer la présence de mutations sur les gènes IDH1/2 dans 59% des cas.²⁶

ii. EXT1/EXT2

Lorsque des mutations touchent les gènes EXT1 et EXT2 (exostosines 1 et 2), la polymérisation des héparanes sulfates est incomplète. Ces glycosaminoglycanes (GAGs) ne pourront donc plus se lier à la protéine de signalisation impliquée dans le développement : l'Indian hedgehog (IHH). Cela conduit à une perte de polarité des chondrocytes et donc, une prolifération anarchique de ces cellules.^{12,13}

iii. IHH/PTHrP

La voie de signalisation induite par les protéines Indian hedgehog et Parathyroid hormone related protein (IHH/PTHrP) est également impliquée dans le processus de tumorigenèse. En effet, cette voie est activée afin de contrôler la croissance et la différenciation chondrocytaire. Dans un contexte pathologique, la voie IHH/PTHrP est perpétuellement activée, ce qui induit la prolifération anarchique des chondrocytes sans induire un blocage de la différenciation chondrocytaire.^{12,27} Ces mutations sont présentes à hauteur de 18% au sein des chondrosarcomes.²⁸

Toutefois, les mutations touchant des gènes impliqués dans les voies de signalisation décrites ci-dessus ne permettent pas, à elles seules, de déclencher la genèse d'un chondrosarcome. Néanmoins, elles prédisposent le tissu aux transformations malignes futures que nous allons désormais aborder.

2) Modifications géniques tardives donnant lieu à des tumeurs malignes

Ces modifications sont retrouvées dans des chondrosarcomes de grades 2 et 3 intervenant directement au niveau d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, en modulant leur expression.

i. Rb et p53

C'est notamment le cas pour les voies impliquant les gènes suppresseurs de tumeurs rétinoblastomes (Rb) et p53 étant décrites pour être mutées respectivement dans 96% et 50% des chondrosarcomes conventionnels.²⁸ Dans les chondrosarcomes de plus haut grade, une perte de l'hétérozygotie de Rb est observée empêchant ainsi sa liaison au facteur de transcription E2F et inhibant la voie « suppresseur de tumeurs » (Figure 9). L'atteinte de la voie p53, connue pour contrôler les check-points lors des transitions en phase G1/S et G2/M, est décrite dans plus de 90% des chondrosarcomes.¹² L'inactivation de la protéine p53 peut avoir lieu à la suite de la liaison avec la protéine Murine Double Minute 2 (MDM2) (Figure 9), dont la surexpression a été retrouvée à hauteur de 33% dans les chondrosarcomes de haut grade et son taux d'ARNm (acide ribonucléique messager) est corrélé au grade histologique.²⁹

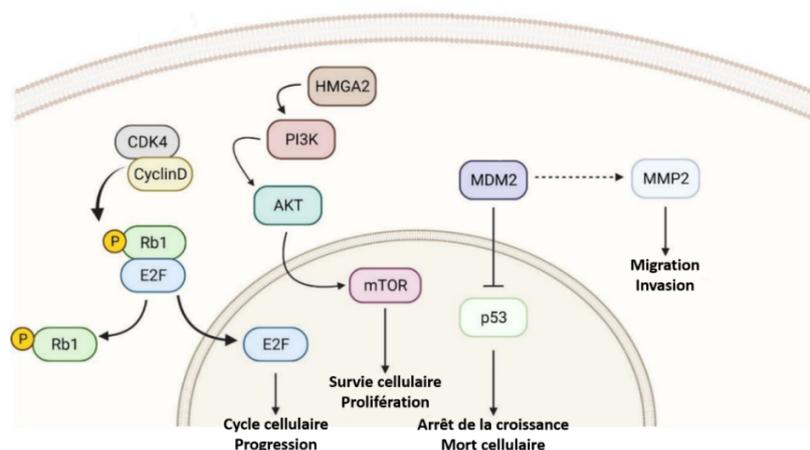


Figure 9: Présentation simplifiée des voies de signalisations impliquant Rb, p53 et PI3K-Akt-mTOR.

ii. PI3K-Akt-mTOR

Cette voie de signalisation est largement décrite dans la littérature car elle joue un rôle majeur dans la croissance, la prolifération et la survie cellulaire. L'activation de cette voie est permise par la fixation de facteurs de croissance sur les récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase (RTK) et sérine-thréonine kinase (Akt) (Figure 9). La voie de signalisation PI3K-Akt induit de nombreux messagers cellulaires, tels que « mammalian target of rapamycin » (mTOR), qui régulent la progression

du cycle cellulaire, la prolifération et la croissance cellulaire, l'autophagie et l'angiogenèse. Au sein des chondrosarcomes conventionnels, l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR a été observée dans 69 % des échantillons cliniques.³⁰

3) Mécanismes induisant ces modifications géniques

i. Anomalies chromosomiques

Depuis les années 90, plusieurs scientifiques ont observé que les chondrosarcomes étaient sujets à de nombreux remaniements chromosomiques favorisant la tumorigénèse.³¹ Ces remaniements ont lieu au cours des divisions cellulaires successives entraînant une répartition aberrante des chromosomes dans les cellules tumorales filles. Ces dernières présenteront un pourcentage élevé de monosomies et de variations du statut de ploïdie. Il est à noter que les chondrosarcomes périphériques les plus prolifératifs présentent une perte d'hétérozygotie sur de nombreux loci tandis que les chondrosarcomes centraux montrent des noyaux plutôt diploïdes voire haploïdes avec des anomalies chromosomiques de types 9p21, 10, 13q14 et 17p13.³² Il a été démontré que la suppression du locus 9p21 est notamment impliquée dans la progression des chondrosarcomes *in vivo*.³³

Au-delà de la répartition et de la modification de certains gènes clés lors des divisions cellulaires, induisant la tumorigénèse du chondrosarcome, l'expression génique peut également être modifiée par la méthylation/déméthylation de l'ADN (acide désoxyribonucléique) ou encore par l'intervention de microARNs comme cela va être étudié par la suite.

ii. Epigénétique : hyperméthylations de l'ADN et modifications d'histones

Une étude italo-suédoise, menée sur 22 chondrosarcomes, a mis en évidence des hyperméthylations de l'ADN dans 41% des échantillons étudiés, avec notamment une hyperméthylation^a du promoteur du gène suppresseur de tumeur p16, entraînant ainsi son inhibition.¹³ Une étude *in vitro* a également montré le rôle de l'hyperméthylation du facteur de transcription RUNX3, considéré comme suppresseur de tumeurs, sur l'augmentation de la prolifération et la réduction de l'apoptose dans les cellules de chondrosarcome.³⁴ Chez les patients atteints de chondrosarcomes, l'expression de RUNX3 a ensuite été corrélée à l'amélioration de leur taux de survie.³⁴ Comme évoqué précédemment, l'hyperméthylation retrouvée au niveau de nombreux

^a L'hyperméthylation de l'ADN permet une meilleure compaction de la chromatine et est donc associée à une diminution de l'expression génique.

promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur au sein des chondrosarcomes serait induite par la mutation d'IDH.³⁵

Au niveau des modifications d'histones, la protéine méthyltransférase EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) semblerait être impliquée dans les chondrosarcomes de haut grade et pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante.³⁶

iii. microARNs

Aujourd'hui, l'implication des microARNs (miRs) est clairement établie dans le chondrosarcome et semble corrélée au grade de malignité de la pathologie telle que présenté dans la Figure 10. Les trois miARNs principaux retrouvés sont : miR-451a, miR-21-5p, miR-140-3p. miR-451a est majoritairement surexprimé dans les chondrosarcomes de grade 1 (21,8%). En revanche, miR-21-5p est surexprimé dans les chondrosarcomes de grade 3 (10,0%). Enfin, miR-140-3p est principalement surexprimé dans les chondrosarcomes de grade 2 (47,5%) mais également significativement présent dans les chondrosarcomes de grade 1 (18,3%) et 3 (23,4%).³⁷

Il est intéressant de citer, en plus, le miR-519d dont l'expression aurait pour conséquence d'augmenter le potentiel métastatique de la tumeur.³⁸ Une étude récente a également mis en évidence un fort niveau d'expression de miR-211 dans des biopsies de chondrosarcomes par rapport aux tissus sains environnants. Ce niveau d'expression a été corrélé au grade histologique ainsi qu'au mauvais pronostic pour le patient.³⁹

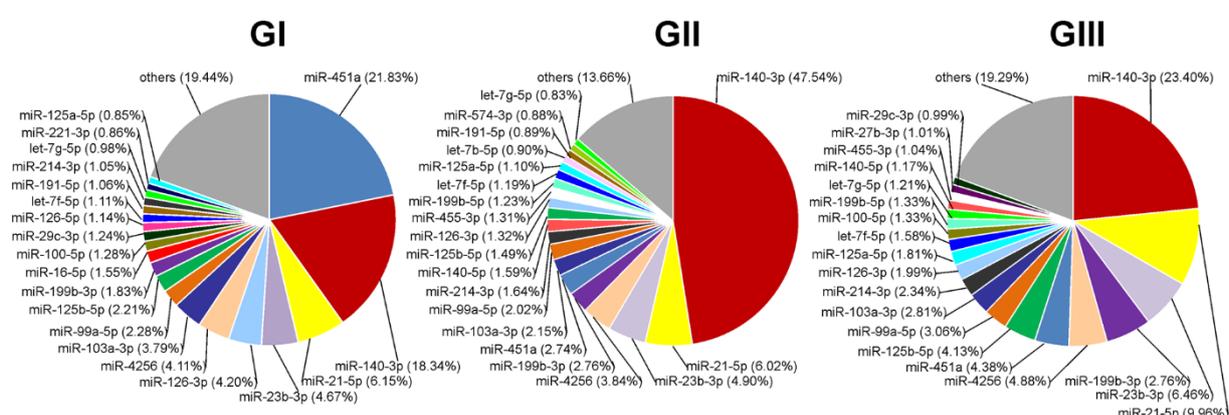


Figure 10: Pourcentages de chaque microARN identifié par séquençage dans des chondrosarcomes conventionnels centraux de grade 1 (GI), 2 (GII) et 3 (GIII).³⁷

Maintenant que nous avons passé en revue les mécanismes génétiques et épigénétiques associés dans la tumorigenèse du chondrosarcome, voyons comment cette pathologie est diagnostiquée en clinique.

D) Diagnostic du chondrosarcome

1) Symptômes

La découverte de cette pathologie chez un patient est souvent fortuite lors d'un examen ou d'une intervention de routine.

Les symptômes associés aux chondrosarcomes varient en fonction de l'emplacement et de la taille de la tumeur.⁴⁰ Le symptôme le plus répandu est la douleur osseuse. Elle débute par une sensibilité au niveau de l'os porteur de la tumeur et évolue, de plus en plus, vers une douleur persistante. Lorsque la diaphyse de l'os (partie médiane des os longs) est atteinte, une inflammation se met en place induisant un gonflement et des rougeurs à la surface de la peau. Il peut s'ensuivre une fracture osseuse. En effet, la tumeur, au cours de son développement central ou périphérique, peut finir par trop fragiliser l'os.

2) Recommandations

Le diagnostic et la prise en charge du chondrosarcome nécessite une approche multidisciplinaire en plusieurs étapes regroupant des cliniciens, des radiologues et des pathologistes dans le but d'apporter, aux patients, la solution thérapeutique la plus appropriée. L'examen de première intention fait appel à l'imagerie anatomique.⁴¹

i. Imageries anatomiques conventionnelles retrouvées en clinique

La radiographie conventionnelle en planaire est le premier examen radiologique. Lorsque le diagnostic de malignité ne peut être définitivement exclu sur les radiographies, une imagerie par résonance magnétique (IRM) de l'ensemble du compartiment avec les articulations adjacentes doit être réalisée. L'IRM est actuellement considérée comme la meilleure modalité de stratification locale pour les tumeurs touchant les extrémités des membres, la colonne vertébrale et le bassin. La tomodensitométrie (TDM) peut fournir des informations supplémentaires sur l'atteinte osseuse et peut être choisie comme modalité d'imagerie principale pour d'autres sites primaires.⁴²

- **La radiographie**

Ainsi, lors de l'imagerie d'un chondrosarcome, les radiographies planaires permettent d'identifier l'agressivité de la lésion. Les tumeurs de bas grade présentent classiquement une marge géographique lobulaire, tandis que la destruction osseuse, avec un aspect mité ou infiltrant, indique des lésions de grade supérieur. Le remodelage cortical, l'épaississement cortical et la réaction

périostique sont également évocateurs d'un chondrosarcome central. Les radiographies des chondrosarcomes centraux des os longs montrent typiquement une région de lyse mixte et des scléroses identifiables par des anneaux et des arcs de minéralisation de la matrice chondrale. Elles sont observées dans 60 à 78 % des cas (Figure 11a).¹⁴

- **La tomodensitométrie**

La TDM, ou scanner, permet de mettre en évidence certaines caractéristiques difficilement visualisables par radiographie, telles que les destructions corticales par érosion endo-osseuse, mais également l'invasion métastatique. Le scanner permet également une meilleure appréciation de la minéralisation de la matrice mais aussi de la profondeur et du degré de l'érosion endo-osseuse (Figure 11b).^{43,44}

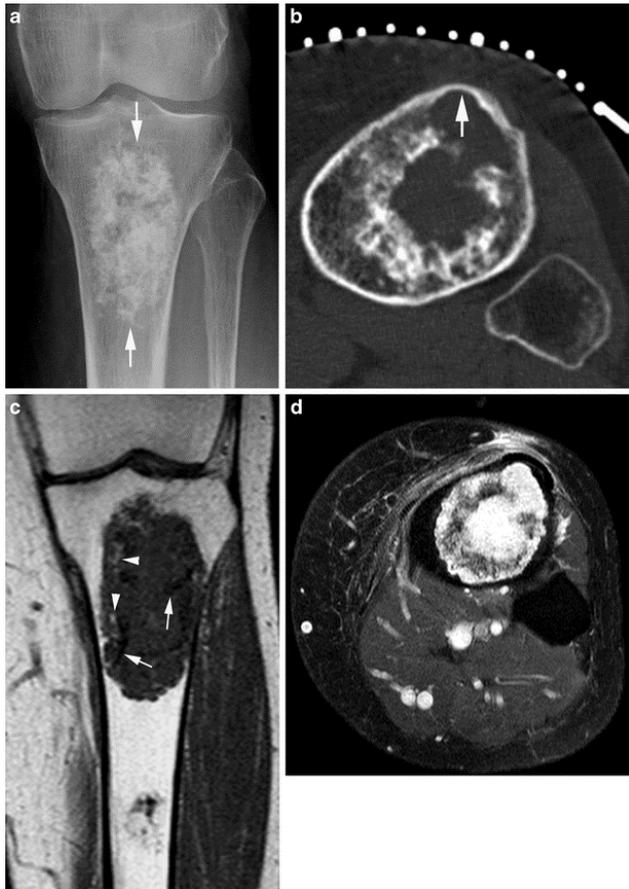
- **L'imagerie par résonance magnétique**

Comme pour la tomodensitométrie, la profondeur et l'étendue de l'érosion endo-osseuse, l'extension extra osseuse et les modifications corticales engendrées par la tumeur sont toutes clairement observées par IRM.¹⁴

En pondération T_1^b , la lésion présente généralement un signal avec une intensité faible à intermédiaire. Toutefois dans 35% des cas, de petites zones mouchetées sur la masse tumorale peuvent être observées avec une intensité de signal élevée. Des zones présentant une intensité de signal nul sont également retrouvées sur les images et sont dues à une minéralisation de la matrice (Figure 11c).^{11,14} Avec une imagerie pondérée en T_2^c , les zones non calcifiées de la tumeur présentent une intensité de signal très élevée en raison de leur forte teneur en eau alors que les zones qui présentent une minéralisation de la matrice auront une intensité de signal faible et hétérogène (Figure 11d).

^b T_1 correspond au temps nécessaire pour que l'aimantation longitudinale retourne à 63% de sa valeur finale.

^c T_2 correspond au temps mis par l'aimantation transversale pour perdre 63% de sa valeur initiale.



(a) La radiographie antéropostérieure du genou montre une lésion du tibia proximal (flèches) qui révèle la minéralisation caractéristique de la matrice en anneau et arc de type chondral. (b) Le scanner axial montre le degré d'érosion endo-osseuse du cortex (flèche), qui n'est pas apprécié sur la radiographie. (c) L'IRM coronale pondérée en T_1 montre l'aspect lobulaire classique du chondrosarcome. La lésion a une intensité de signal faible à intermédiaire avec des zones où le signal est nul dû à la minéralisation de la matrice (flèches) et des zones avec une intensité de signal plus élevée due à la moelle jaune graisseuse médullaire piégée (têtes de flèches). Notez la petite lésion cartilagineuse au milieu du tibia, qui représente très probablement un enchondrome. (d) L'IRM axiale pondérée en T_2 révèle de manière distincte la profondeur et l'étendue de l'érosion endo-osseuse.

Figure 11: Différentes imageries d'un même chondrosarcome de bas grade¹¹

Les septa interlobulaires du chondrosarcome présentent également une faible intensité de signal T_2 (Figure 12).



Figure 12: IRM sagittale pondérée en T_2 d'un chondrosarcome intramédullaire de haut grade.¹¹

La lésion est hyper-intense avec des septa internes hypo-intenses (têtes de flèches) et présente une extension extra-osseuse postérieure.

L'intérêt majeur de l'IRM semble résider dans la possibilité de différencier les chondrosarcomes des tumeurs bénignes, mais aussi de distinguer les chondrosarcomes de haut grade, des chondrosarcomes de bas grade.^{45,46} Par exemple, la graisse de la moelle jaune piégée au sein du chondrosarcome, observable en pondération T_1 suggérera la présence d'une tumeur de bas grade, tandis que l'extension des tissus mous orientera plutôt le diagnostic vers un chondrosarcome de haut grade.^{11,14}

ii. Prélèvements

La biopsie sera l'examen de référence permettant d'effectuer un diagnostic spécifique et différentiel dans le but d'orienter l'approche thérapeutique. Le prélèvement tumoral est dirigé dans la zone identifiée comme la plus agressive sur les imageries anatomiques mais il peut, toutefois, ne pas être représentatif de l'hétérogénéité tumorale du chondrosarcome et limiter le diagnostic différentiel.⁴⁷

La biopsie liquide ne fait pas encore partie des recommandations cliniques concernant la prise en charge du chondrosarcome mais elle pourrait rapidement le devenir.⁴⁸ En effet, récemment, Lyskjær *et al.* ont montré le potentiel de l'ADN tumoral circulant chez les patients atteints de chondrosarcomes présentant des mutations pour IDH1/2. L'expression de biomarqueurs peut également aider à la stratification des patients tout en ajoutant une valeur pronostique.⁴⁹

3) Diagnostic différentiel

Le principal diagnostic différentiel au sein des sarcomes osseux est celui des chondromes, notamment dans la différenciation entre un chondrome bénin et un chondrosarcome central de bas grade ou une tumeur cartilagineuse atypique mais aussi entre un chondrosarcome et un ostéosarcome.^{50,51}

Actuellement, aucun test de laboratoire d'analyses médicales ne permet de discriminer un chondrosarcome et de confirmer un diagnostic même si de plus en plus de biomarqueurs sont découverts. Il reste donc primordial de recourir à une concertation multidisciplinaire lorsque des cas complexes se présentent afin que l'expérience de chaque praticien (oncologues, radiologues, chirurgiens, anatomopathologistes, etc) puisse permettre d'établir un diagnostic.

4) Facteurs pronostiques

La masse ou volume tumoral(e) et la présence de métastases détectables sont les deux principaux facteurs cliniques pris en compte pour évaluer le stade de ces cancers. Un bilan d'extension exploitant la TDM, l'IRM et la tomographie par émission de positons (TEP) au 2-[¹⁸F]fluoro-2-désoxy-d-

glucose ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$) devra être effectué afin d'évaluer une potentielle dissémination métastatique.⁵² L'évaluation de la dissémination métastatique est essentielle pour permettre la définition d'un stade tumoral grâce à la classification TNM de l'OMS. Elle prend en compte la taille de la tumeur et l'envahissement de tissus voisins, l'atteinte des ganglions lymphatiques et la présence ou non de métastases distants.

De surcroît, la localisation du site primitif de la tumeur et son grade sont déterminants pour la prise en charge thérapeutique qui sera proposée au patient. Par exemple, une localisation de la tumeur au niveau du squelette appendiculaire est associée à une meilleure valeur pronostique qu'une localisation au niveau du pelvis.⁵³

E) Prise en charge thérapeutique du chondrosarcome

Les dernières recommandations fournies, en 2021, par la Société européenne d'oncologie médicale (ESMO), concernant la prise en charge du chondrosarcome, seront détaillées ci-dessous.⁵²

Malgré les avancées scientifiques, le pilier du traitement du chondrosarcome squelettique reste, aujourd'hui encore, la chirurgie (Figure 13).

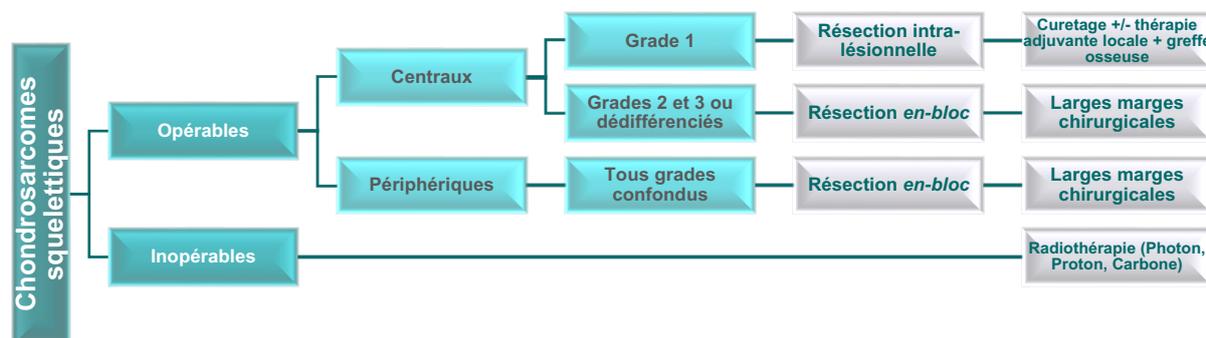


Figure 13: Arbre décisionnel pour la prise en charge thérapeutique des chondrosarcomes squelettiques.¹⁷

1) Chirurgie

L'objectif de la résection chirurgicale des chondrosarcomes squelettiques est le contrôle local de la tumeur, tout en conservant l'intégrité physique du patient. En effet, il est aujourd'hui rare de recourir à des amputations pour des sarcomes osseux des membres.²⁴ Il est, néanmoins plus courant, de devoir recourir à des méthodes de reconstruction. Celles-ci peuvent être de l'ostéosynthèse, des auto ou allogreffes osseuses, mais aussi à la mise en place de prothèses massives (Figure 14).

Concernant la prise en charge chirurgicale du chondrosarcome, l'ESMO recommande que les tumeurs cartilagineuses atypiques des os longs, au niveau des membres, soient prises en charge par curetage intra-lésionnel avec ou sans traitement adjuvant local (par exemple en cryochirurgie), avec

de grandes chances de succès.^{54,55} La cryochirurgie ou cryoablation, a recours à de l'azote liquide ou du dioxyde de carbone liquide pour détruire les cellules tumorales grâce au froid intense.

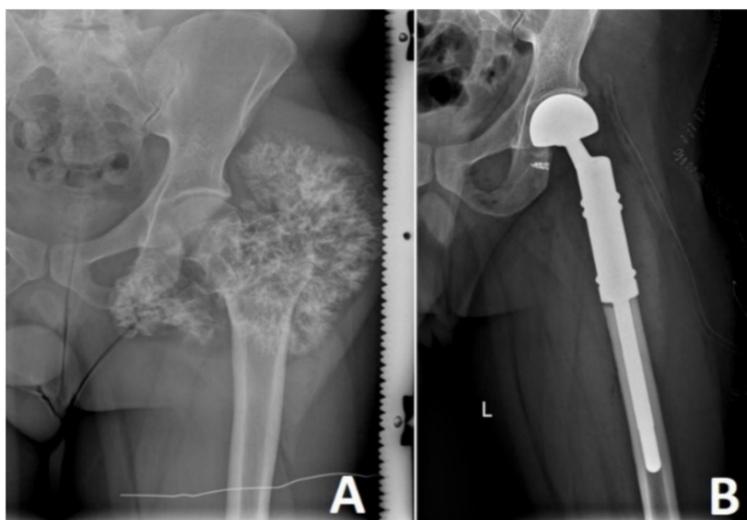


Figure 14: Radiographie préopératoire d'un chondrosarcome de grade 2 touchant l'extrémité proximale du fémur gauche (A). Radiographie postopératoire avec reconstruction fémorale par prothèse modulaire (B).¹⁶

Les chondrosarcomes périphériques, mais aussi les chondrosarcomes centraux de plus hauts grades, doivent être excisés chirurgicalement avec une résection dite *en-bloc* et de larges marges chirurgicales (Figure 13).⁵²

Dans environ 15% des cas, le grade de malignité de la tumeur récidivante est supérieur à celui de la tumeur primaire et est associé à un phénotype dédifférencié.¹⁷ Les récidives locales de chondrosarcomes de grade 1, sans évolution du grade de malignité et localisées au niveau des os longs, seront réséquées en intra-lésionnel et une thérapie adjuvante sera appliquée. Cependant, en cas d'invasion des tissus mous, une exérèse avec de larges marges chirurgicales sera privilégiée.¹⁷ Concernant les récidives locales des chondrosarcomes de grade 1 au niveau des os plats, ainsi que celles de grades 2 et 3, elles seront prises en charge de manière plus radicale avec une large exérèse.⁵⁶ Cependant, l'utilisation du statut des marges chirurgicales comme facteur pronostique est controversée dans la littérature.⁵⁷⁻⁵⁹ Fromm *et al*, ont démontré en 2018, que le statut des marges chirurgicales n'avait pas d'impact sur la survie globale des patients atteints de chondrosarcomes conventionnels centraux.⁵³

Concernant les chondrosarcomes localisés dans des régions anatomiques complexes où l'exérèse chirurgicale peut-être risquée, comme les os du crâne ou de la colonne vertébrale, la radiothérapie, détaillée ci-après, est privilégiée.

2) Radiothérapie

La radiothérapie peut être mise en place avant la chirurgie, nous parlerons de radiothérapie néoadjuvante, pour réduire la taille de la tumeur afin de permettre sa résection complète. Elle peut être prescrite après la chirurgie, en thérapie adjuvante, si la résection est complète mais que le chondrosarcome est de haut grade ou dédifférencié ou si la résection de la tumeur est incomplète. Dans ces cas-là, nous parlerons de radiothérapie curative. En revanche, si la région anatomique impliquée est inaccessible à la chirurgie comme pour les chondrosarcomes à la base du crâne ou au niveau du rachis, nous parlerons de radiothérapie palliative.

D'une manière générale, les chondrosarcomes sont considérés comme des tumeurs radorésistantes.^{17,60} En effet, elles se caractérisent par une croissance lente et une faible fraction de cellules en division mais aussi par une faible vascularisation et donc un faible taux d'oxygénation. Néanmoins, quelques études ont démontré que la radiothérapie externe pouvait améliorer le taux de survie des patients atteints de chondrosarcomes.

La radiothérapie externe conventionnelle est généralement appliquée avec une dose supérieure à 60 Gy pour les chondrosarcomes afin d'assurer un contrôle local de la tumeur. Récemment, une méta-analyse a démontré que les taux de survie à 5 ans des patients atteints de chondrosarcomes recevant une radiothérapie à forte dose (> 60 Gy) étaient significativement plus élevés (70 %) que ceux des patients recevant une radiothérapie à faible dose (entre 40 à 60 Gy) (57%) (Figure 15a).⁶¹

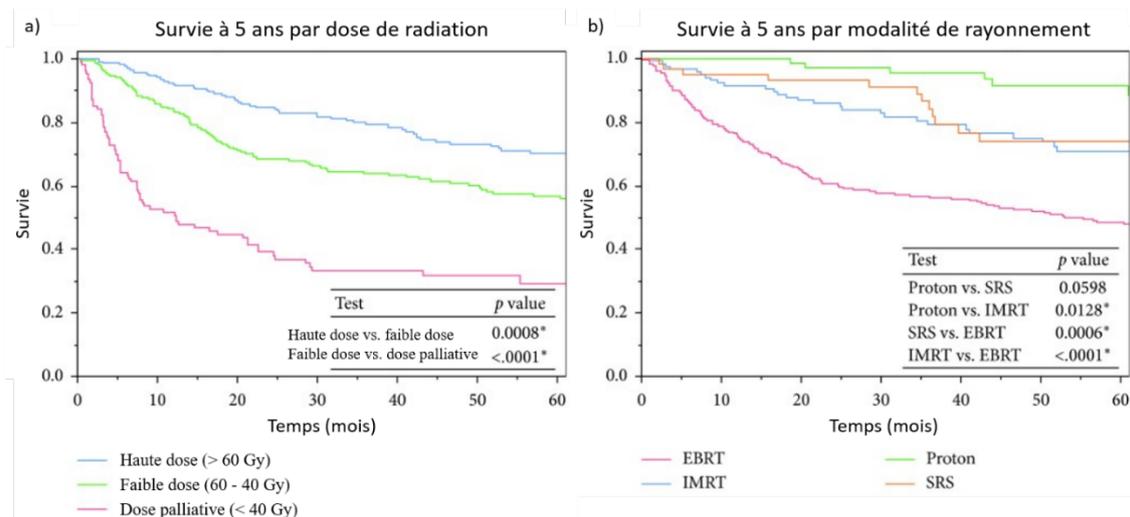


Figure 15: Courbes de Kaplan-Meier stratifiées par (a) dose et (b) modalité, comparant la survie à 5 ans de patients atteints de chondrosarcomes et traités par radiothérapie.⁶¹ EBRT : radiothérapie externe conventionnelle; IMRT : radiothérapie par modulation d'intensité ; Proton : protonthérapie ; SRS : radiochirurgie stéréotaxique.

En revanche, cette même étude a aussi mis en évidence que la radiothérapie externe conventionnelle présentait des taux de survie à 5 ans plus faibles que les nouvelles radiothérapies externes (Figure 15b). C'est pour cette raison que depuis quelques années, plusieurs nouvelles sources de rayonnement sont utilisées pour réaliser de la thérapie par rayons ionisants. Il s'agit de l'hadronthérapie qui fait appel à des particules lourde comme les ions carbonés (carbone-thérapie) et protons (proton-thérapie), en effet, les faisceaux de particules lourdes permettent de délivrer une dose élevée au niveau du volume cible en limitant la dose diffusée.⁶² En effet, une étude portant sur l'utilisation de la protonthérapie à haute dose (> 70 Gy) pour le traitement de chondrosarcomes de la base du crâne a permis d'estimer à 93,6% la survie globale à 7 ans des patients.⁶³

3) Chimiothérapie

Ce traitement va préférentiellement agir sur les cellules se divisant rapidement. Il pourra donc soit détruire directement les cellules cancéreuses, soit les empêcher de se multiplier. La chimiothérapie peut être proposée avant le traitement principal, de manière néoadjuvante, ou après, en thérapie adjuvante.

i. Chimiothérapies conventionnelles

Il existe 4 classes de cytotoxiques utilisées en cliniques (Figure 16) :

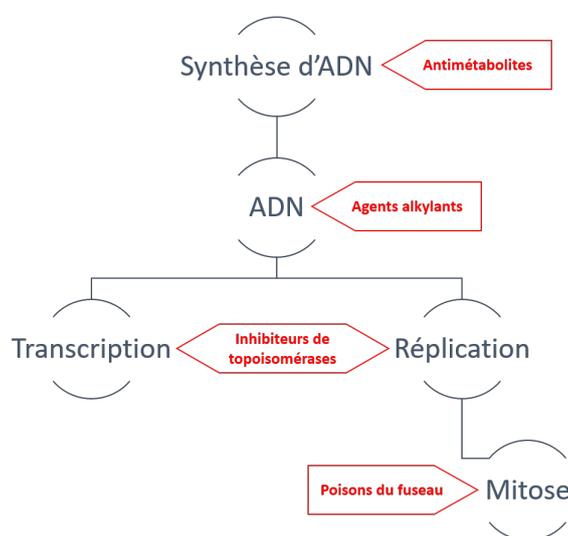


Figure 16: Les différents niveaux d'action des 4 classes d'agents chimiothérapeutiques.

- Les antimétabolites sont des analogues structuraux des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN, entraînant ainsi une inhibition de la réplication et donc empêchant la transcription de l'ADN lors de la phase S du cycle cellulaire. Exemple : gemcitabine, 5-fluorouracile.

- Les agents alkylants se lient à certains nucléotides, formant ainsi des ponts intra- ou inter-caténaux, afin de modifier la conformation de la double hélice d'ADN. Par la suite, la transcription ou la réplication de l'ADN sera impossible. Exemple : cyclophosphamide, ifosfamide.
- Les inhibiteurs de topoisomérases agissent directement au niveau de la transcription et de la réplication de l'ADN. Ces enzymes sont essentielles car elles maintiennent l'arrangement de l'ADN et évitent la formation de coupures. Exemple : daunorubicine, mitoxantrone (anthracyclines).
- Les poisons du fuseau interviennent au niveau de la mitose, en interagissant avec la polymérisation et/ou dépolymérisation des microtubules, bloquant ainsi la division cellulaire. Le docétaxel est inclus dans cette classe.

Certaines molécules peuvent être catégorisées dans 2 classes, c'est notamment le cas de la doxorubicine qui rentre dans la classe des agents alkylants mais aussi des inhibiteurs de topoisomérases. Cette molécule a la capacité d'inhiber l'action de la topoisomérase II tout en se liant à la guanine.

Dans le cas de chondrosarcomes non résécables, la chimiothérapie peut être utilisée seule mais le taux de survie à 5 ans des patients chute à 2% car l'efficacité globale de la chimiothérapie est limitée.^{64,65} Également, un faible taux de réponse objective (14 %), déterminé à l'aide des critères d'évaluation RECIST (response evaluation criteria in solid tumors), a été rapporté pour une chimiothérapie à la gemcitabine suivi de docétaxel dans un essai clinique de phase II, chez les patients atteints de chondrosarcomes non résécables ou en récurrences locales (NCT00073983).⁶⁶

Concernant la chimiothérapie adjuvante administrée après chirurgie, elle n'a malheureusement pas fait ses preuves dans les chondrosarcomes centraux. En effet, les tumeurs cartilagineuses atypiques ou chondrosarcomes de bas grade ont un taux de survie à 5 ans de 83% et les chondrosarcomes de grades II et III ont un taux de survie à 5 ans plus faible de l'ordre de 36% et 3%, respectivement, en raison de la fréquence plus élevée de métastases.^{17,23} La chimiothérapie à base d'anthracyclines a montré une efficacité modeste dans le chondrosarcome mésoenchymateux. Une revue suggère plutôt de l'utiliser en traitement adjuvant, associée à la résection chirurgicale, afin d'améliorer nettement la survie des patients avec des chondrosarcomes différenciés par rapport à la chirurgie seule.⁶⁷ Cette étude anglaise, incluant 22 patients, montre des taux de survie à 5 ans de l'ordre de 36% pour les patients ayant reçu une chimiothérapie à base de doxorubicine et de cisplatine contre une absence de survie à 1 an pour les patients seulement traités avec de la chirurgie.⁶⁸ De plus, une étude rétrospective a mis en évidence l'intérêt d'employer l'ifosfamide en chimiothérapie adjuvante à la suite d'une résection chirurgicale chez les patients atteints de chondrosarcomes différenciés, avec un taux de survie à 5 ans passant à 27% contre 6% en cas de chirurgie seule.⁶⁹

Pour conclure, les chondrosarcomes mésenchymateux et dédifférenciés semblent plus sensibles à la chimiothérapie qu'elle soit néoadjuvante ou adjuvante comparativement aux chondrosarcomes conventionnels. C'est pour cette raison que nous observons un développement croissant des chimiothérapies ciblées.

ii. Nouvelles chimiothérapies ciblées

- Ciblage de la voie de signalisation des tyrosines kinases

Les tyrosines kinases sont d'importantes médiatrices impliquées dans la croissance cellulaire, la différenciation, l'angiogenèse, le métabolisme et l'apoptose en réponse à des stimuli internes ou externes via les RTK. Une surexpression des RTK, tels que l'EGFR (epidermal growth factor receptor), l'IGF-IR (Insulin-like growth factor-I receptor), le PDGFR (platelet-derived growth factor receptor), le FGFR (fibroblast growth factor receptor) ou encore le VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor), a été retrouvée dans les chondrosarcomes.^{30,70} Des essais de phase II étudient actuellement l'efficacité du pazopanib en monothérapie qui est un inhibiteur puissant et sélectif de PDGFR, chez les patients atteints de chondrosarcomes non résécables chirurgicalement ou métastatiques.^{71,72} Le pazopanib s'est révélé prometteur chez 46 des 47 patients inclus dans l'essai clinique de Chow *et al*, avec un taux de contrôle de la maladie atteignant les 43% après 16 semaines de traitement (NCT01330966). Plus prometteur encore, l'association sirolimus et cyclophosphamide a montré son efficacité chez 10 patients atteints de chondrosarcomes non résécables traités avec un taux de contrôle de la maladie à 70%.⁷³ Un essai clinique de phase II vient également d'étudier cette association médicamenteuse (sirolimus + cyclophosphamide) mais les résultats ne sont pas encore disponibles (NCT02821507). Un autre inhibiteur de mTOR, l'évérolimus, a montré son efficacité sur le modèle orthotopique SWARM de chondrosarcome de rat, avec une inhibition de la croissance tumorale de 56,7%. De plus, l'évérolimus, employé en chimiothérapie adjuvante, a permis de retarder significativement voire d'empêcher la récurrence tumorale chez les rats porteurs de chondrosarcome SWARM ayant subi un curetage intralésionnel incomplet.⁷⁴ Un essai clinique de phase I (NCT01061788) portant sur des patients atteints de tumeurs solides à des stades avancés et dans lequel un patient atteint d'un chondrosarcome a été inclus, a montré le potentiel intérêt d'associer l'évérolimus et le ganitumab. En effet, une réponse thérapeutique importante et durable (> 24 mois) a été observée chez ce patient.⁷⁵

- **Ciblage des microARNs**

Plusieurs études précliniques menées *in vivo* démontrent qu'en augmentant l'expression de certains microARNs présents dans les cellules tumorales de chondrosarcomes, ces derniers seraient capables de réduire l'expression de certains oncogènes. C'est notamment le cas pour miR-494 dont la surexpression inhibe la prolifération et l'invasion des cellules tumorales via SOX9 dans un modèle murin de chondrosarcome humain SW1353.⁷⁶ Une surexpression de miR-454-3p a également entraîné une réduction significative du volume tumoral chez des souris porteuses de xénogreffes de chondrosarcomes HCS-2/8.⁷⁷ En ciblant SOX4, la surexpression induite de miR-129-5p permet de réduire de manière significative le volume tumorale des xénogreffes de chondrosarcomes humains SW1353 et JJ012.⁷⁸ Une étude plus récente a également démontré que la surexpression artificielle de deux microARN, miR-143 et miR-145, pouvait entraîner un important effet suppresseur de tumeur *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffe orthotopique JJ012.⁷⁹

Une autre stratégie vise à développer des oligonucléotides anti-microARN afin d'inhiber l'expression de microARNs pro-tumoraux. Cette méthode a fait ses preuves dans des modèles murins de chondrosarcomes humains JJ012 et CS-1, respectivement de grade 2 et 3. L'inhibition de miR-181a a permis de réduire le volume tumoral de 32% et a presque doublé le taux de survie des animaux traités en passant de 23% à 45%.⁸⁰

- **Inhibition du métabolisme de glucose**

L'EGFR et l'enzyme de la lactate déshydrogénase-A (LDHA) ont une action indirecte sur la glycolyse des cellules de chondrosarcomes. De plus, ces deux protéines ont un niveau d'activité élevé dans les lignées cellulaires de chondrosarcomes qui sont résistantes au cisplatine et à la doxorubicine, respectivement.^{81,82} Ainsi, la combinaison d'un inhibiteur de l'EGFR et du cisplatine au cours d'une thérapie entraîne *in vitro* un arrêt du cycle cellulaire ainsi qu'une augmentation de l'apoptose au sein de deux lignées tumorales de chondrosarcome CH2879 et JJ012.⁸¹ De la même manière, des chercheurs ont démontré que l'association d'un inhibiteur de la LDHA à la doxorubicine permettait de réduire significativement le volume tumoral chez des souris xénogreffes avec des cellules de chondrosarcome humain SW1253.⁸²

- **Régulation négative de l'activité des cyclines**

Il a été montré que la diacéréine inhibe efficacement la prolifération et la viabilité de deux lignées cellulaires humaines de chondrosarcomes SW1353 et Cal-78 en régulant à la baisse l'expression de la cycline B1 et de sa kinase cycline-dépendante CDK1.⁸³ Ainsi, l'inhibiteur de CDK4, le palbociclib a montré *in vivo* une réduction du volume tumoral chez des souris porteuses de xénogreffes SW1353.⁸⁴

- Induction de l'apoptose via le stress du réticulum endoplasmique

L'activation du stress du réticulum endoplasmique par la réponse UPR (unfolded protein response) associé à un programme de mort cellulaire par apoptose s'est avérée prometteuse dans le traitement du chondrosarcome. En effet, une étude réalisée *in vivo* a montré qu'un dérivé de benzofuran avait permis de réduire, de manière significative, le volume tumoral, chez des souris porteuses de xénogreffes de cellules JJ012.⁸⁵

- Ciblage de la famille Bcl-2

Une étude a montré qu'une inhibition sélective de Bcl-xl conduit à une sensibilité accrue à la doxorubicine et au cisplatine *in vitro* sur 3 lignées cellulaires de chondrosarcome. *In vivo*, dans un modèle de chondrosarcome de rat SWARM orthotopique, l'inhibition sélective de Bcl-xl entraîne une inhibition de la croissance tumorale bien qu'aucune sensibilisation à la doxorubicine n'ait été observée.⁸⁶

- Ciblage de la mutation IDH

Dans la littérature concernant le chondrosarcome, seuls des inhibiteurs de IDH1 tels que l'AGI-5198, le DS-1001b et l'AG-120, sont retrouvés.

Dans une première étude, l'inhibiteur AGI-5198 a montré une diminution des taux de D-2HG dans les lignées cellulaires de chondrosarcomes humains JJ012 et HT1080 ainsi qu'une inhibition cellulaire, dose dépendante, de la capacité à former des colonies et à migrer. Le cycle cellulaire de ces lignées est également interrompu, ce qui induit l'apoptose de ces cellules tumorales.⁸⁷

L'utilisation du DS-1001b semble prometteuse puisque ce traitement a permis d'inhiber la prolifération des lignées cellulaires de chondrosarcome L835 et JJ012 *in vitro* et *in vivo* en diminuant les taux de D-2HG.⁸⁸

Actuellement, un essai clinique de phase I évalue l'innocuité, la pharmacocinétique, la pharmacodynamique et l'activité clinique de l'AG-120 dans les tumeurs solides avancées, incluant des chondrosarcomes présentant une mutation IDH1 (NCT02073994). Les premiers résultats ont montré une importante et persistante inhibition de 2-HG dans les chondrosarcomes mutants pour IDH1.⁸⁹ Un essai clinique de phase II utilisant AG-120 a débuté en Mars 2020 pour évaluer l'efficacité de l'AG-120 chez les patients atteints de chondrosarcomes avancés et/ou métastatiques ou récidivants (NCT04278781).

- **Inhibitions d'enzymes méthyltransférases et désacétylases**

Une étude menée sur le chondrosarcome SWARM de rat a montré que la perte de méthylation de l'ADN, induite par le traitement à la décitabine, s'est accompagnée d'une augmentation du pouvoir invasif des cellules *in vitro*, ainsi que d'une augmentation de la croissance tumorale *in vivo*. En revanche, après l'arrêt du traitement à la décitabine, un niveau équivalent de la méthylation de l'ADN a été retrouvé *in vitro* entre les cellules contrôles et traitées.⁹⁰

Le DZNep ou le 3-Deazaneplanocine A, inhibiteur spécifique de l'histone méthyltransférase EZH2, a récemment montré une activité de pré-sensibilisation au cisplatine *in vivo* dans les modèles de xéno greffes de chondrosarcomes humains SW1353 et JJ012.⁹¹ Dans ces mêmes modèles précliniques, la trichostatine A et le valproate de sodium, des inhibiteurs de l'histone désacétylase (HDAC), ont montré une activité antitumorale *in vivo* via un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M.⁹²

Des combinaisons thérapeutiques associant des inhibiteurs de l'HDAC, comme la décitabine et le vorinostate, et des inhibiteurs de la DNMT (ADN méthyltransférase), ont montré une activité antitumorale *in vivo* dans les xéno greffes JJ012.⁹³ Un essai clinique de phase II est d'ailleurs actuellement en cours afin d'évaluer cette stratégie thérapeutique pour la prise en charge des chondrosarcomes conventionnels inopérables ou métastatiques (NCT04340843).

- **Ciblage de la voie de signalisation Hedgehog (Hh)**

Deux autres études ont rapporté que l'inhibition directe de la voie Hh, par l'intermédiaire du saridegib et du ciliobrevin A, diminuait significativement la prolifération cellulaire, la capacité d'invasion et de migration *in vitro*. Une inhibition de la croissance tumorale *in vivo* a également été mise en évidence dans différents modèles PDX (Patient derived xenografts) de chondrosarcomes.^{94,95}

Cependant, les résultats encourageants de ces études précliniques n'ont pas été retrouvés au cours d'essais cliniques ciblant la voie Hh dans le chondrosarcome. En effet, un essai clinique de phase II (NCT01310816) sur le saridegib n'a pas montré d'amélioration des survies sans progression et globale chez les patients atteints de chondrosarcomes non résecables ou métastatiques. Un autre essai clinique de phase II portant sur le vismodegib (NCT01267955), incluant des patients avec des chondrosarcomes avancés, n'a pas atteint le taux de bienfaits cliniques initialement fixé à 40% puisqu'à 6 mois, ce dernier s'élevait à 25,6%.⁹⁶

iii. Chimiorésistance

La nature même du chondrosarcome rend ce cancer chimiorésistant. Sa faible vascularisation limite considérablement la délivrance des principes actifs à la tumeur. Par ailleurs, la nature chondrogénique et dense de sa matrice extracellulaire est à l'origine d'une pression interstitielle élevée au sein du tissu tumoral, qui représente un véritable obstacle physique à la diffusion des molécules thérapeutiques.^{97,98}

Trois principaux facteurs sont impliqués dans la chimiorésistance des chondrosarcomes :

- **Le faible taux de division des chondrocytes tumoraux** : l'efficacité des chimiothérapies conventionnelles est basée sur l'index mitotique élevé des cellules tumorales qu'elles ciblent.¹⁷
- **La nature hypoxique du tissu tumoral** est identifiée comme l'un des facteurs responsables de la résistance des chondrosarcomes aux traitements de chimiothérapies et de radiothérapies.⁹⁹⁻¹⁰²
- **L'expression de la P-glycoprotéine**, codée par le gène MDR1 (Multi drug resistance), véritable « pompe à efflux » transmembranaire qui expulse les principes actifs du milieu intracellulaire.¹⁰³ Il est intéressant de citer les stratégies d'inhibition de l'expression de MDR1 (notamment par siRNA) qui ont permis d'augmenter la chimiosensibilité des chondrosarcomes et qui démontrent bien le rôle de MDR dans la résistance de ce cancer à la chimiothérapie.¹⁰⁴

Le développement de la pathologie à l'échelle cellulaire a été exposé ainsi que son diagnostic et sa prise en charge thérapeutique en clinique. Malgré tous les outils actuellement disponibles, de nombreuses stratégies thérapeutiques n'ont pas tenu leurs promesses et le chondrosarcome reste inclus dans la catégorie des tumeurs chimio- et radiorésistance. La littérature pointe du doigt le microenvironnement tumoral et le désigne comme principale cause de la résistance thérapeutique. Dans la partie suivante, une présentation détaillée du microenvironnement tumoral sera abordée d'un point de vue cellulaire puis vasculaire et enfin, matriciel.

II) Le chondrosarcome et son microenvironnement tumoral

Dans la prise en charge diagnostique et thérapeutique de la pathologie cancéreuse, si la cible première reste la cellule cancéreuse, le microenvironnement est clairement indissociable de cette dernière et joue un rôle primordial. Le microenvironnement tumoral n'est autre que l'environnement des cellules tumorales à l'échelle microscopique. Cette notion a été introduite pour la première fois en 1889 par Stephen Paget, le présentant comme étant le sol nécessaire à la croissance de la graine. La plasticité du microenvironnement tumoral est à l'origine de son évolution conjointe à celle des cellules tumorales.

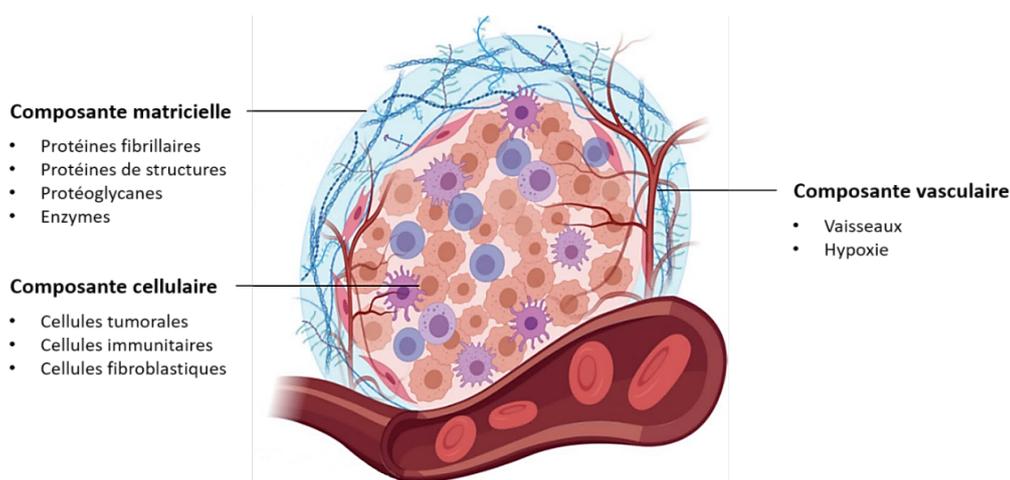


Figure 17: Représentation schématique des cellules tumorales et du microenvironnement du chondrosarcome.

Le microenvironnement tumoral se met en place afin de supporter et de favoriser la multiplication des cellules cancéreuses et donc, *in fine*, la propagation du cancer tout en lui conférant certaines propriétés de résistance face aux thérapies conventionnelles. Le microenvironnement tumoral est constitué d'une composante cellulaire, d'une composante vasculaire et d'une composante matricielle (Figure 17). La composante cellulaire du microenvironnement est composée de cellules immunitaires et de cellules fibroblastiques qui peuvent être associées aux cellules tumorales. La composante vasculaire regroupe à la fois les vaisseaux mais aussi l'hypoxie tumorale. La composante matricielle est quant à elle composée de la matrice extracellulaire (composante insoluble) et des molécules solubles dans le liquide interstitiel.

A) Composante cellulaire

1) Cellules tumorales

Les chondrocytes sont les cellules composant les cartilages et par conséquent les chondrosarcomes. Ces cellules deviennent tumorales en développant certaines caractéristiques propres (Figure 18). En effet, les cellules tumorales possèdent une plasticité phénotypique, pouvant être influencée par le microbiome environnant, avec une instabilité génomique entraînant de nombreuses mutations mais aussi induite par une reprogrammation épigénétique. Ceci leur confère de nombreux avantages tels que l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, l'échappement immunitaire et surtout la résistance à la mort cellulaire. Certaines des cellules tumorales peuvent même rentrer en sénescence. Elles possèdent également un potentiel de réplication illimité avec le maintien des signaux prolifératifs, ce qui entraîne une reprogrammation de leur métabolisme énergétique. Les cellules cancéreuses ont également acquis la capacité d'invasion métastatique et d'induction de l'angiogenèse tout en promulguant l'inflammation tumorale.¹⁰⁵

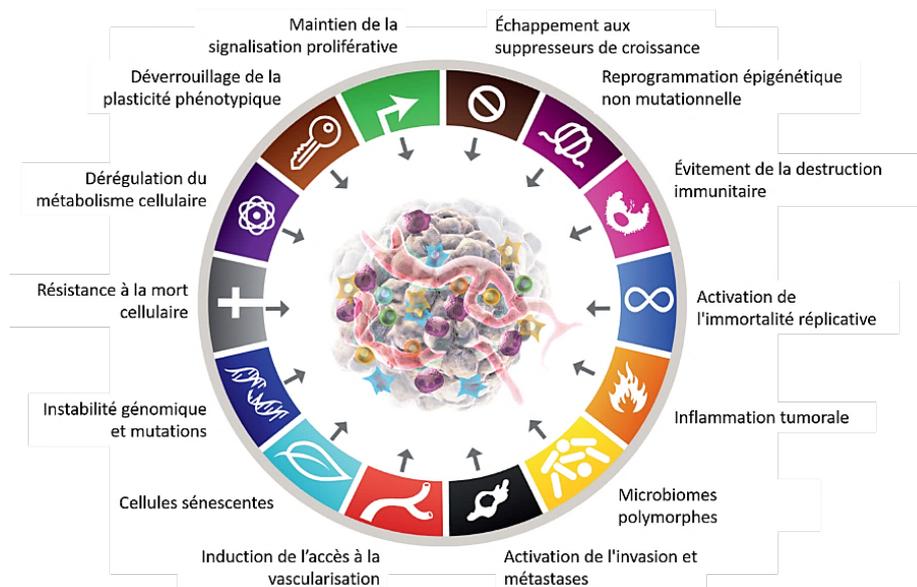


Figure 18: Les principales caractéristiques du cancer.¹⁰⁵

2) Cellules fibroblastiques

Les CAFs (cancer-associated fibroblasts) sont une large population de cellules fibroblastiques présente au niveau de la matrice extracellulaire. Ces cellules dérivent en général de fibroblastes déjà présents dans le stroma et sont ensuite recrutées puis activées par des facteurs de croissance. Les CAFs peuvent aussi sécréter des facteurs de croissance tels que TGF β , FGF2 et PDGF mais aussi des cytokines impliquées dans l'angiogenèse et la résistance aux thérapies.¹⁰⁶

3) Cellules immunitaires

Les cellules du système immunitaire interagissent constamment avec les cellules tumorales via des signaux moléculaires médiés par des cytokines ou des chemokines. À ce jour, peu d'études portent sur l'investigation de l'environnement immunitaire du chondrosarcome.

i. Macrophages

Les macrophages associés aux tumeurs (tumor associated macrophages, TAMs) sont répartis en deux catégories, M1 et M2, qui ne jouent pas du tout le même rôle au sein du microenvironnement tumoral. En effet, les macrophages M1 sont activés par la cytokine IFN γ et ont un effet anti-tumoral alors que les M2, induits sous l'expression d'interleukines telles que l'IL-4, IL-10 et IL-13, sont des cellules favorisant la tumorigenèse. Les TAMs présentent les marqueurs cellulaires CD68 et CD163 et sécrètent des cytokines induisant la suppression des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques du microenvironnement tumoral. Des chercheurs ont voulu étudier l'infiltrat immunitaire à la fois sur des échantillons humains de chondrosarcomes mais aussi sur des échantillons de chondrosarcomes

SWARM de rats. Leur étude a démontré qu'il y avait une infiltration importante de TAMs M2 CD163+ dans les chondrosarcomes les plus invasifs alors que des concentrations plus élevées de lymphocytes T CD8+ cytotoxique sont retrouvées dans des chondrosarcomes moins agressifs et ce, pour les deux modèles étudiés.¹⁰⁷

ii. Lymphocytes

Les lymphocytes infiltrant les tumeurs, les TILs, sont de différentes catégories et inclus les lymphocytes T cytotoxiques, natural killer, auxiliaires et régulateurs, mais aussi des lymphocytes B. Théoleyre *et al.* ont démontré l'importante cytotoxicité et l'efficacité des TILs sur les cellules d'ostéosarcome.¹⁰⁸

- Lymphocytes T

- T Cytotoxiques (CD3+, CD8+)

Ces lymphocytes peuvent reconnaître et détruire les cellules cancéreuses à l'aide d'enzymes apoptotiques. Ces lymphocytes jouent un rôle dans le microenvironnement tumoral du chondrosarcome en ralentissant la progression tumorale.¹⁰⁷

- T Natural Killer (CD16+, CD56+)

Les lymphocytes T Natural Killer sont des cellules cytotoxiques. Elles peuvent induire un stress chez les cellules cancéreuses détectées à la suite d'absence d'antigènes de cellules saines à leur surface.¹⁰⁹

- T Auxiliaires (CD3+, CD4+)

Tout comme les macrophages, ils peuvent se diviser en deux groupes, T_H1 et T_H2. Les T_H1 ont la capacité de sécréter des cytokines inflammatoires pour favoriser la destruction des cellules cancéreuses alors que les T_H2 sécrètent des cytokines anti-inflammatoires et sont donc plutôt pro-tumorigènes.¹¹⁰

La balance entre ces deux populations dépend du stade de développement de la pathologie et donc de son grade.

- T Régulateurs (CD4+, CD25+, FOXP3+, CD45RA+)

Ces cellules sont divisées en deux pools, une partie des Treg se trouve dans le sang alors que la deuxième partie est dans le microenvironnement tumoral. Les Treg présents au sein du microenvironnement tumoral ont un rôle majoritaire dans l'immunosuppression comparé aux Treg du sang périphérique. Leur rôle est donc contexte-dépendant.

- **Lymphocytes B (CD19+, CD20+)**

Ils ont une action anti-tumorigène en s'attaquant directement aux cellules cancéreuses ou bien en ayant une action pro-tumorigène avec la sécrétion de cytokines et en activant les Treg du microenvironnement tumoral.

Une étude a rapporté que 52% des chondrosarcomes dédifférenciés étudiés exprimaient PD-L1 (programmed death-ligand 1) et que cette expression corrélait avec l'expression de TILs. Les TILs identifiés correspondaient à des lymphocytes T cytotoxiques à hauteur de 58 % des chondrosarcomes dédifférenciés primaires et des métastases étudiés. Les lymphocytes T régulateurs étaient plus fréquents dans les métastases (18%) que dans les chondrosarcomes dédifférenciés primaires (4 %). La proportion de lymphocytes T auxiliaires était de 24% dans les métastases contre 38% dans les chondrosarcomes dédifférenciés primaires.¹¹¹

Un travail plus récent a étudié, les TILs et les TAMs de 27 chondrosarcomes conventionnels et 49 chondrosarcomes dédifférenciés humains.¹¹² La population immunitaire principale est représentée par les TAMs CD68+, à hauteur de 25%, dont l'expression a été corrélée à la présence de métastases et donc au mauvais pronostic.

iii. Cellules dendritiques (CD11c+, CD83+, CD123+)

Les cellules dendritiques dérivent de la moelle osseuse et elles présentent des antigènes tumoraux aux cellules du système immunitaire.

Une analyse multiomique sur 98 chondrosarcomes humains conventionnels a été réalisée récemment. Elle propose trois groupes pour classer les chondrosarcomes en fonction de leur phénotype immunitaire. Le premier groupe rassemble les chondrosarcomes présentant un nombre élevé de MDSCs. Le second groupe est composé de chondrosarcomes présentant une forte infiltration de lymphocytes T et peu de cellules dendritiques, qui correspondraient à un épuisement immunitaire, tandis que le troisième groupe inclut des chondrosarcomes avec très peu de cellules immunitaires. Les deux premiers groupes, riches en cellules immunitaires, rassemblent des chondrosarcomes caractérisés par la mutation IDH, un grade élevé et un œdème péri-tumoral. Le premier groupe inclus également des chondrosarcomes dont la matrice extracellulaire présente par une transformation myxoïde.¹¹³

B) Composante vasculaire

1) Angiogenèse tumorale

Au sein du microenvironnement tumoral, les vaisseaux néoformés au cours de l'angiogenèse tumorale possèdent de nombreuses anomalies architecturales et fonctionnelles (Figure 19). Les tortuosités, les dilatations et/ou rétrécissements du diamètre vasculaire, les vaisseaux borgnes ou encore l'endothélium vasculaire discontinu sont à l'origine d'un flux sanguin hétérogène « chaotique » induisant des territoires hypoxiques voire nécrotiques et conduisant à la mise en place d'un « cercle vicieux » participant à la chimiorésistance.

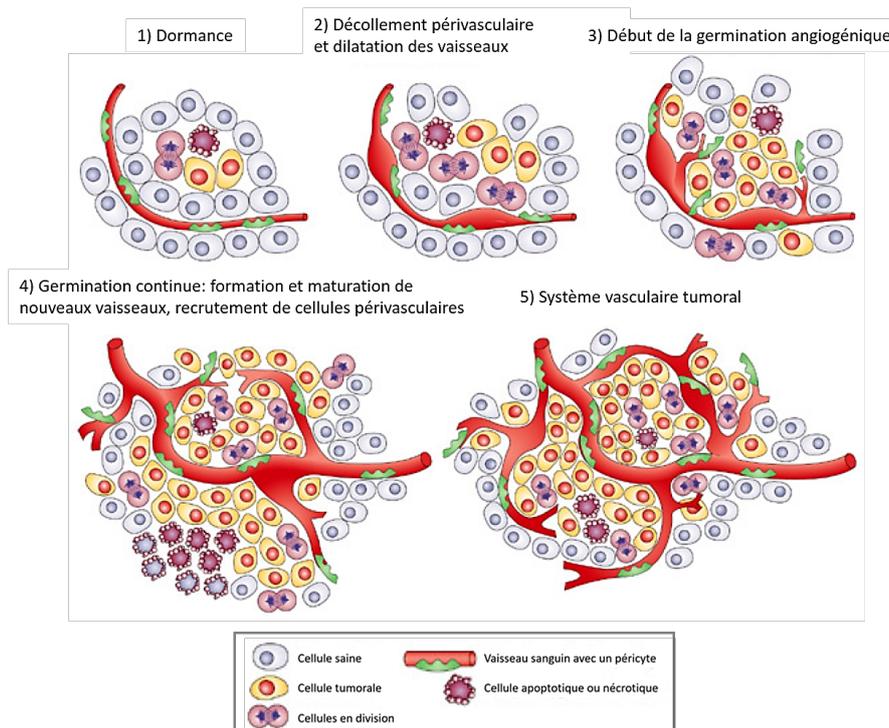


Figure 19: Angiogenèse tumorale.

Les cellules endothéliales tumorales (TECs) sont atypiques par rapport aux cellules endothéliales rencontrées en conditions physiologiques. Une étude *ex vivo* réalisée sur des prélèvements de chondrosarcomes humains a montré que l'indice de la prolifération des TECs, était significativement plus haut dans les chondrosarcomes conventionnels de grade 2 et 3 que de grade 1 et dédifférenciés.¹¹⁴

Les péricytes sont impliqués dans le remodelage membranaire des vaisseaux au cours de l'angiogenèse tumorale. Une étude a démontré que l'indice de couverture des microvaisseaux par les péricytes corrélait à la dédifférenciation des chondrosarcomes.¹¹⁴

2) Hypoxie

L'hypoxie se caractérise par une faible concentration en oxygène au sein des tissus avec une concentration inférieure à 1% d'oxygène (7,5 mmHg). Lors de la croissance tumorale, la multiplication cellulaire est rapide et les vaisseaux sanguins néoformés, de structure anormale, entraînent l'apparition de zones hypoxiques avec un pourcentage faible en oxygène, inférieur à 1%, contre 3 à 7% dans les tissus sains. Deux types d'hypoxies sont distingués à ce jour :

- L'**hypoxie aigüe ou intermittente** est caractérisée par des fluctuations locales et transitoires du flux sanguin.
- L'**hypoxie chronique ou prolongée** est dépendante de la limite de diffusion de l'oxygène dans les tissus, généralement comprise entre 70 et 180 μm . Elle apparaît lorsque la néo-angiogenèse est insuffisante face à la prolifération des cellules tumorales puisque la distance inter-capillaire devient supérieure à la limite de diffusion de l'oxygène. Un gradient d'oxygène va donc se mettre en place et les cellules passeront d'un statut de normoxie à un statut d'hypoxie puis d'anoxie au plus loin des vaisseaux. Ceci va conduire à une mort cellulaire et l'apparition de zones nécrotiques.

Ces deux types d'hypoxies sont retrouvés simultanément au sein du tissu tumoral. Ainsi, l'aspect fluctuant de l'hypoxie aigüe et la distribution altérée de l'oxygène, liée à l'hypoxie chronique, contribuent à l'hétérogénéité du microenvironnement tumoral.

En situation d'hypoxie, les cellules cancéreuses vont mettre en place des mécanismes adaptatifs afin d'assurer leur survie et leur prolifération malgré cet environnement hostile.

3) Facteurs HIFs

i. Présentation

La réponse cellulaire à l'hypoxie fait intervenir les facteurs de transcription HIF (Hypoxia inducible factor). Ce sont des hétérodimères composés d'une sous-unité HIF-1 β constitutivement exprimée et d'une sous-unité HIF-1 α dont l'expression est régulée par l'oxygène. Il existe trois isoformes de la sous-unité HIF- α : HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α . Une fois couplés avec la sous-unité HIF-1 β , ils formeront respectivement les facteurs de transcription HIF1, HIF-2 et HIF-3.

En conditions normoxiques, HIF-1 α est rapidement dégradée. Les prolyl-4-hydroxylases (PHDs) 1-2 vont hydrolyser les prolines p402 et p564 de la sous-unité HIF-1 α . La sous-unité HIF- α hydroxylée va ensuite être reconnue par la protéine suppresseur de tumeur VHL (Von Hippel-Lindau) qui va recruter des ubiquitines ligases E3. Ces protéines vont catalyser la poly-ubiquitination de HIF- α qui sera ensuite dégradée par la voie dépendante du protéasome.

En conditions hypoxiques, le processus d'hydroxylation par les PHDs sera inhibé, ce qui va conduire à la stabilisation, à la translocation au niveau nucléaire puis à la dimérisation de la sous-unité HIF-1 α avec la sous-unité HIF-1 β , formant ainsi le facteur de transcription HIF-1. Une fois l'assemblage terminé, l'hétérodimère HIF pourra se fixer au niveau des motifs consensus A/GCGTG présents dans les régions HRE (Hypoxia responsive element) afin d'amorcer la transcription de gènes cibles (Figure 20).¹¹⁵

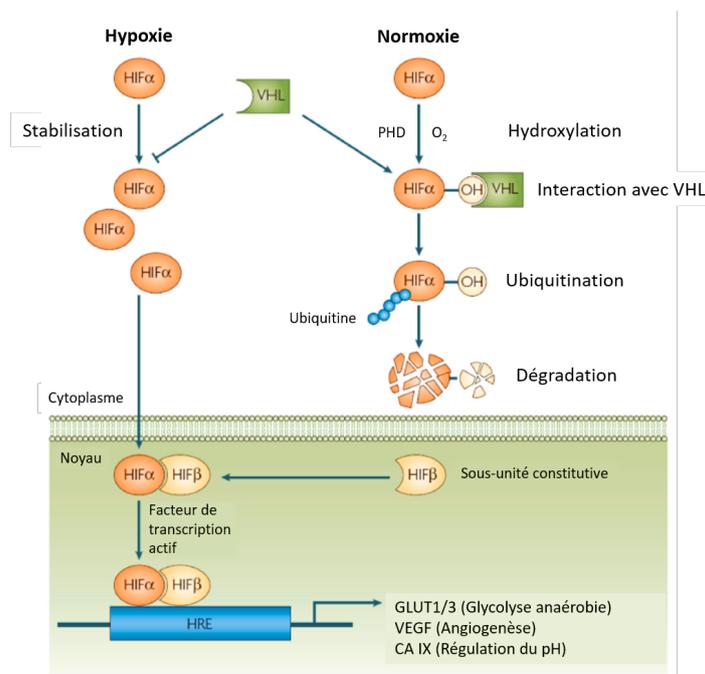


Figure 20: Assemblage du facteur HIF permettant d'activer la transcription de gènes en fonction de l'oxygénation du tissu.¹¹⁵

Concernant le chondrosarcome, Bœuf *et al.* ont démontré le rôle de l'hypoxie dans la progression de ce cancer.¹⁰² En effet, l'accumulation nucléaire de la sous-unité HIF-1 α dans le chondrosarcome central de haut grade (2 et 3) indique que ce facteur de transcription pourrait jouer un rôle important dans la régulation du métabolisme cellulaire et de la néoangiogenèse et donc dans la progression des chondrosarcomes. La présence de HIF-1 α dans les prélèvements tumoraux a tendance à réduire la survie cumulée des patients atteints de chondrosarcomes (Figure 21A). La présence de CAIX (carbonic anhydrase 9) a également été révélée dans les prélèvements de patients atteints de chondrosarcomes centraux et son expression réduit de manière significative le taux de survie cumulée. CAIX est définie comme étant un marqueur prédictif de l'évolution du chondrosarcome, indépendamment de son grade histologique (Figure 21A).¹⁰²

Une méta-analyse sur les sarcomes osseux a récemment mis en évidence une corrélation négative entre la surexpression de HIF-1 α et la survie chez les patients atteints d'ostéosarcomes et de chondrosarcomes, suggérant ainsi que la sous-unité HIF-1 α pourrait être utilisée, elle aussi, comme un biomarqueur pronostique.¹¹⁶

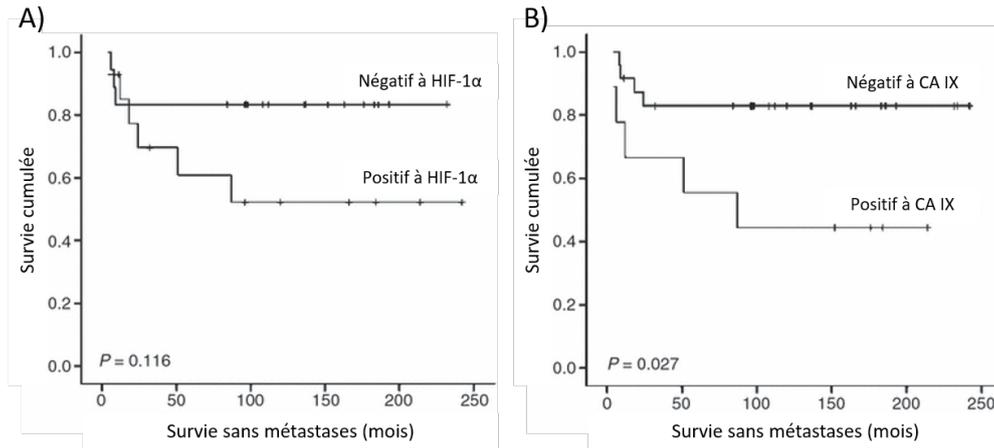


Figure 21: Courbes de Kaplan-Meier représentant la survie des patients atteints de chondrosarcomes en fonction de l'expression de HIF-1α (A) et de CAIX (B) dans les biopsies tumorales¹⁰²

Au sein du chondrosarcome, plusieurs études ont mis en évidence la présence du facteur HIF-1 mais aussi de HIF-2. En plus des deux études décrites précédemment (Bœuf *et al.* et Luo *et al.*), une étude récente a quantifié l'expression de HIF-1α par immunohistochimie sur des prélèvements humains de tumeurs cartilagineuses bénignes et de chondrosarcomes à différents grades. Les résultats ont démontré que l'expression de HIF-1α était la plus forte dans les chondrosarcomes de grade 3 alors qu'elle était nulle dans les tumeurs cartilagineuses bénignes (Figure 22).¹⁰⁰

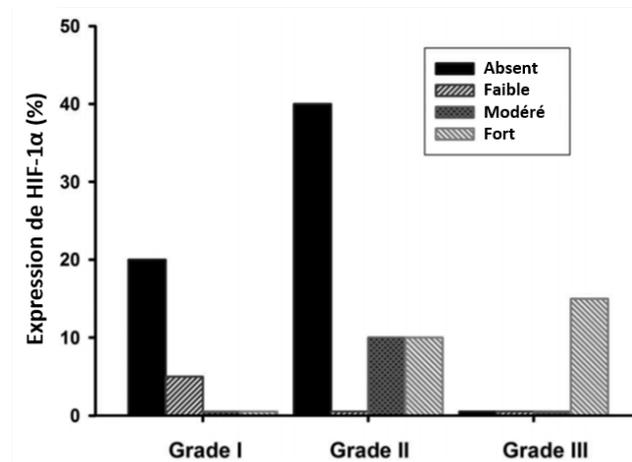


Figure 22: Profils d'expression de HIF-1α en fonction du grade de malignité des chondrosarcomes.¹⁰⁰

Des chercheurs ont également montré, *in vitro* sur la lignée cellulaire humaine de chondrosarcome JJ012, qu'en réalisant un knockout (KO) du gène IDH1 muté, ils constataient une diminution des niveaux d'expression du gène HIF-1α. La mutation d'IDH1 semblerait pouvoir induire l'expression de HIF-1α dans le chondrosarcome.¹¹⁷

Concernant HIF-2, une étude a démontré qu'il n'était pas non plus exprimé dans les tumeurs cartilagineuses bénignes mais qu'il était exprimé à hauteur de 25% dans les chondrosarcomes humains étudiés.¹⁰¹ Dans une seconde étude, les taux d'ARNm et de protéines d'HIF-2α ont été quantifiés et

ont montré dans les chondrosarcomes étudiés, un taux élevé de 52,9% d'HIF-2 α corrélant positivement avec le grade de malignité. D'un point de vue immunohistochimique, l'expression protéique tumorale élevée de HIF-2 α a été identifiée comme un marqueur de mauvais pronostic.¹¹⁸

En préclinique, des souris porteuses de xénogreffes JJ012 ou SW1353 ont permis de mettre en évidence que l'expression de HIF-2 α favorisait la croissance tumorale mais aussi la propension à développer des métastases. De plus, pour le modèle JJ012, l'inhibition pharmacologique de HIF-2 α améliorait l'efficacité de la chimiothérapie conventionnelle. Ces résultats ont été également confirmés *in vitro*. Enfin, comme pour HIF-1 α , des mutations sur les gènes IDH1 ou IDH2, respectivement dans les lignées JJ012 et SW1253 avec pour contrôle négatif la lignée OUMS-23 non mutée pour ces gènes, limiteraient la dégradation de HIF-2 α par la voie dépendante du protéasome.¹¹⁹

4) Rôles des facteurs HIFs dans la reprogrammation du métabolisme énergétique du chondrosarcome

i. Modulation de la glycolyse : l'effet Warburg

L'effet Warburg est la capacité des cellules tumorales à métaboliser préférentiellement le glucose en lactate, pour court-circuiter la phosphorylation oxydative, et ceci indépendamment de la concentration en oxygène (Figure 23).¹²⁰

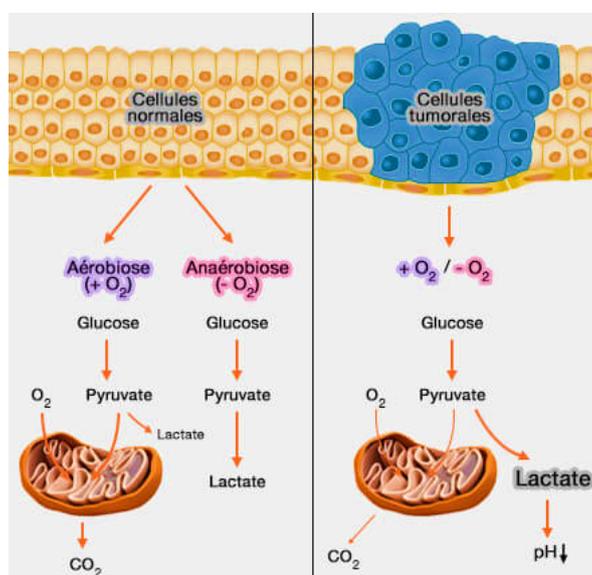


Figure 23: L'effet Warburg.

Dans le chondrosarcome, HIF induit l'augmentation de l'expression d'enzymes impliquées dans la glycolyse comme GAPD (Glyceraldéhyde 3 - phosphate déshydrogénase), l'ALDOA (aldolase A) ou le PKM2 (pyruvate kinase musculaire 2). HIF diminue l'expression du gène MT-CYB (mitochondrially

encoded Cytochrome B) codant pour une protéine jouant un rôle dans la phosphorylation oxydative au sein des chondrocytes.¹²¹

L'expression d' HIF-1 stimule l'expression des gènes codant pour les transporteurs du glucose, et particulièrement GLUT1 dont l'augmentation a d'ailleurs été mise en évidence au sein des chondrocytes tumoraux.¹²²

HIF-1 intervient également sur l'expression du gène de l'hexokinase-2 (HK-2) permettant de faciliter le métabolisme du glucose ou encore en augmentant la disponibilité du lactate dans la cellule. En effet, en favorisant l'expression de la PDK-1 (pyruvate déshydrogénase kinase-1), la conversion du pyruvate en acétyl-CoA est inactivée, ce qui permet au pyruvate d'être disponible dans la cellule pour être converti en lactate via la LDHA dont l'expression est aussi favorisée par HIF-1. La LDHA est surexprimée dans les cellules et les biopsies humaines de chondrosarcomes.

Ces modifications du métabolisme vont contribuer à une acidification progressive du microenvironnement cellulaire.

ii. Acidification du microenvironnement tumoral

En effet, le lactate, synthétisé dans les cellules tumorales en normoxie lors de « l'effet Warburg » mais aussi dans les cellules tumorales hypoxiques lors de la glycolyse anaérobie, est exporté avec un proton dans l'espace extracellulaire grâce au transporteur monocarboxylate 4 (MCT4), entraînant une diminution du pH extracellulaire (pHe) au sein de la tumeur (Figure 24).

Un second transporteur impliqué dans l'acidification du microenvironnement est le transporteur transmembranaire NHE1 (Na^+/H^+ exchanger 1) qui permet le flux entrant d'un ion sodium Na^+ couplé au flux sortant d'un proton H^+ à travers la membrane plasmique (Figure 24).

Enfin, HIF est également impliqué dans l'augmentation de l'expression du gène qui code pour l'enzyme CAIX. Il s'agit d'une glycoprotéine associée à la membrane sous forme dimérique et qui comporte un domaine extracellulaire catalytique, une région « proteoglycan-like » (domaine PG), un domaine transmembranaire qui sert d'encrage à la protéine, et une courte région C-terminale cytoplasmique. CAIX est impliqué dans l'hydratation réversible du CO_2 extracellulaire en acide carbonique (HCO_3^-) formant un proton extracellulaire. HCO_3^- peut ensuite diffuser en dehors de la tumeur ou entrer dans la cellule grâce au transporteur NBC ($\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ co-transporter) (Figure 24).¹²³

Ainsi, l'augmentation des protons dans l'espace extracellulaire conduit à la diminution du pHe, alors que le pH intracellulaire (pHi) est basique voire alcalin. Ce phénomène, appelé « gradient de pH inverse », impacte négativement la distribution et la pénétration cellulaire des drogues, favorisant ainsi la chimiorésistance des tumeurs. En effet, les propriétés acides de l'espace extracellulaire des tumeurs vont protoner les drogues basiques empêchant leur diffusion au travers de la membrane plasmique.

Le pH peut ainsi varier en général entre 7,2 et 7,5 à l'intérieur du cytoplasme des cellules alors que dans l'espace extracellulaire, il peut descendre de 7,3 à 6,4 à la suite de ces différents mécanismes d'acidification.¹¹⁵ Ce gradient de pH inverse au sein du microenvironnement tumoral favorise ainsi la survie des cellules cancéreuses et l'invasion cellulaire.¹²⁰

Depuis quelques années, des études montrent que l'acidose tumorale va, à son tour, influencer les préférences métaboliques des tumeurs. Cela passe, notamment, par une réduction de l'abondance de HIF-1 et une augmentation de l'expression de HIF-2. Ce dernier est identifié comme un régulateur clef de l'adaptation métabolique à l'acidose en favorisant le métabolisme de la glutamine en remplacement du métabolisme du glucose.^{124,125}

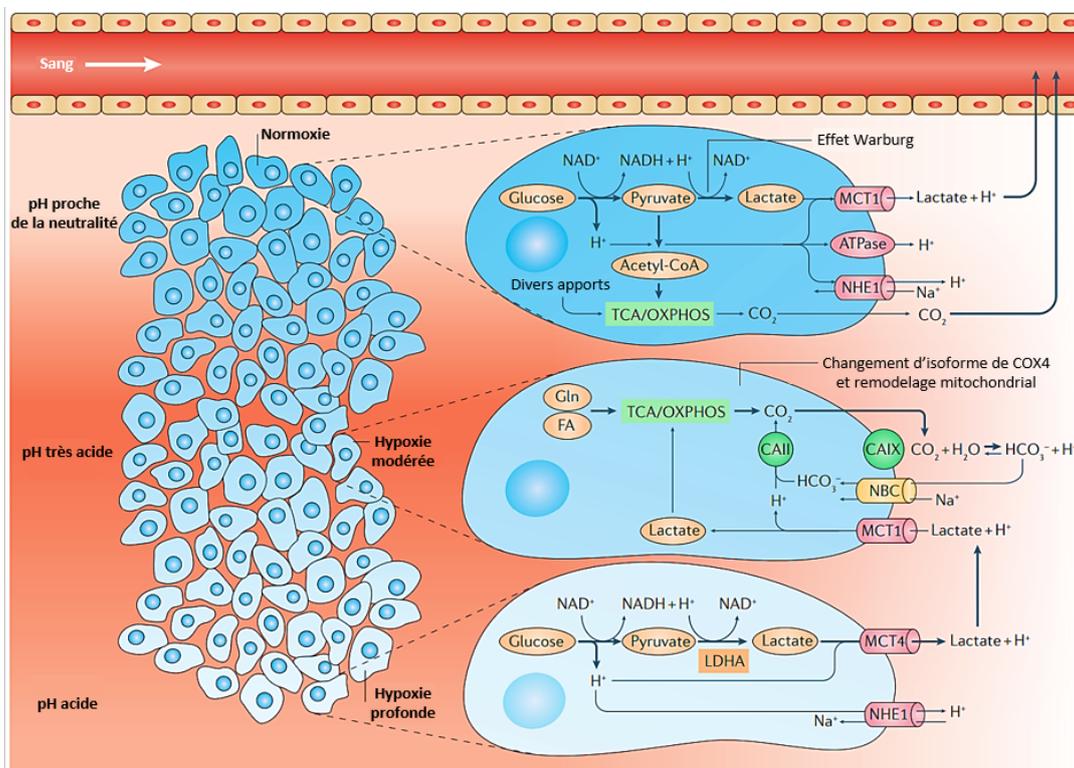


Figure 24: Mécanismes d'acidification du pH extracellulaire en fonction du niveau d'oxygénation du tissu tumoral.¹²⁵

La surexpression de CAIX dans les chondrosarcomes centraux a été démontrée au cours d'une étude portant sur des échantillons de patients. Les résultats de l'étude génomique par PCR et immunohistochimie ont montré que CAIX était significativement plus exprimé dans les chondrosarcomes de grade 2, et que son expression était significativement corrélée à la réduction de la survie sans métastase.¹⁰² Une autre étude est aussi parvenue à mettre en évidence la présence d'autres types de transporteurs comme MCT1 ou de pompes ion/proton telles que NHE1, V-ATPase et CAII, par PCR en temps réel, au sein de cultures primaires de chondrosarcomes prélevés chez des patients, mais aussi dans la lignée cellulaire SW1353.¹²⁶

iii. Invasion cellulaire et dissémination métastatique

Les facteurs HIF-1 α et HIF-2 α permettent aux cellules cancéreuses, via la régulation de l'expression de certains gènes, de synthétiser des molécules capables de dégrader la matrice extracellulaire. C'est notamment le rôle des LOX (Lysyl Oxydase) capables de dégrader les fibres de collagène ou encore des MMPs (Matrix metallopeptidases).¹²⁷

L'expression de MMP-1 a été mise en évidence dans des échantillons humains de chondrosarcomes.¹²⁸ Une autre étude a démontré qu'il existait une corrélation positive entre le score d'immunomarquage des MMPs 2, 3, 9 et 13 et le grade de malignité des échantillons humains de chondrosarcomes prélevés.¹²⁹ Une étude plus récente, portant également sur des échantillons de chondrosarcomes humains, a évalué, par immunohistochimie, l'expression des MMPs 1, 3, 9 et 13. 64% des prélèvements étaient positifs pour MMP-1, 46% pour MMP-3 et 61% pour MMP-9. En revanche, une expression élevée de MMP-9 a été retrouvée dans les chondrosarcomes de plus bas grades (1 et 2) et était associée à une augmentation du temps de survie sans métastases et de survie globale chez les patients atteints de chondrosarcomes étudiés.¹³⁰

Ainsi les facteurs HIFs vont jouer un rôle dans cette dissémination métastatique. L'activation de HIF-1 permet de stimuler l'expression du récepteur CXCR4 (C-X-C motif chemokine receptor 4) et, grâce à son ligand SDF-1 (stromal-derived factor 1) également appelé CXCL12, les voies PI3K/Akt/mTOR et MEK/ERK vont être activées. Ces voies de signalisation sont directement impliquées dans la colonisation et l'adhésion des cellules tumorales au niveau des tissus cibles. Sun *et al.* ont constaté que la surexpression de HIF-1 α en situation d'hypoxie dans des cellules de chondrosarcome humain JJ012 augmentait l'expression de CXCR4 et MMP1, favorisant ainsi l'invasion des cellules *in vitro*.¹³¹ Une autre étude a mis en évidence que tous les prélèvements humains de chondrosarcomes étudiés étaient immunomarqués pour CXCR4. De plus, une importante expression de CXCR4 est retrouvée dans les chondrosarcomes de plus hauts grades suggérant ainsi que CXCR4 pourrait être un potentiel biomarqueur d'agressivité tumorale pour le chondrosarcome.¹³²

iv. Angiogenèse tumorale

Lors d'hypoxie aigüe le facteur HIF-1 permet d'augmenter la densité vasculaire tumorale par son action sur VEGF (vascular endothelial growth factor) alors qu'en situation d'hypoxie prolongée, HIF-2 permettra de réguler son expression. Une étude a d'ailleurs fait le lien entre HIF-1 et VEGF puisqu'*in vitro*, une augmentation de l'expression de VEGF a été observée sur les cellules de chondrosarcomes incubées pendant 24 h en hypoxie, mais aussi qu'un KO de HIF-1 α entraînait une diminution de l'expression de VEGF.¹³³ Kouvaras *et al.* ont plus récemment démontré, en réalisant un immunomarquage de HIF-1 α et VEGF sur des échantillons humains de chondrosarcomes de différents

grades, que l'expression de ces deux marqueurs était fortement corrélée. En effet, tous les chondrosarcomes présentaient un immunomarquage HIF-1 α et VEGF alors que les enchondromes étudiés étaient tous négatifs. Les chondrosarcomes doublement positifs à HIF-1 α et VEGF étaient presque exclusivement des chondrosarcomes à haut grade.¹⁰⁰

C) Composante matricielle

La matrice extracellulaire est un tissu de soutien formant un réseau tridimensionnel de macromolécules insolubles. Elle est présente en grande quantité au sein des tissus conjonctifs, des vaisseaux, ou encore des cartilages et assure l'homéostasie des tissus. Le réseau tridimensionnel de la matrice extracellulaire est composé de protéines fibreuses (collagènes, élastines), des protéines d'adhérence (fibronectines, laminines) et des protéoglycanes (Figure 25). Ce réseau de fibres confère, aux tumeurs solides, une force mécanique mais aussi la possibilité de lier des molécules telles que des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion ou encore les cytokines.¹³⁴

Comme pour le cartilage sain, les cellules tumorales du chondrosarcome synthétisent de la matrice extracellulaire de type chondrogénique, essentiellement composée de collagène et d'un réseau de protéoglycanes contenant des glycosaminoglycanes (GAGs). Au sein du chondrosarcome, la composition de la matrice extracellulaire évolue au cours de la maladie et avec les différents grades de malignité. En effet, plus le grade histologique est élevé et plus la composition de la matrice extracellulaire du chondrosarcome évolue d'une composition proche de celle du cartilage sain avec une matrice chondroïde, vers une composition plus riche en glycoprotéines de type mucine avec une matrice myxoïde ou mucoïde.¹⁶

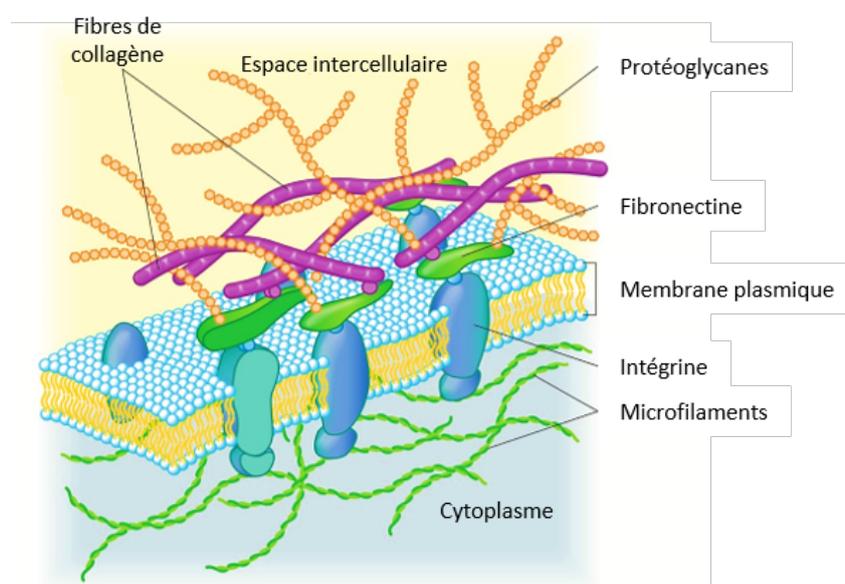


Figure 25: Organisation macromoléculaire de la matrice extracellulaire.

1) Protéines fibrillaires : élastine et collagène

Dans la littérature actuelle, aucune étude ne fait mention d'élastine dans la matrice extracellulaire des chondrosarcomes, seule la présence de différentes fibres de collagène a été décrite. La composition qualitative et quantitative en collagène dans l'espace extracellulaire du chondrosarcome varie fortement en fonction de son grade histologique. Dans les chondrosarcomes de bas grade, la matrice est décrite comme étant chondroïde avec une présence majoritaire des fibres de collagène de type II mais des fibres de collagène de type VI, IX, X et XI sont également retrouvées en faibles quantités.¹³⁵⁻¹³⁸

Concernant les chondrosarcomes de plus hauts grades (II ou III), leur matrice étant en partie myxoïde, elle contient une faible quantité de collagène qui est plutôt de types I et III.^{136,139}

Au niveau des gènes codant pour les fibres de collagène, une étude de Tarpey *et al.* ont mis en évidence que dans 37% des cas de chondrosarcomes étudiés, une mutation du gène COL2A1 engendre une production de collagène de type II non fonctionnel et ce, de manière significativement plus importante dans les chondrosarcomes de grades II et III.^{13,26,136} Le rôle de la protéine COMP (cartilage oligomeric matrix protein) présente dans la matrice extracellulaire du chondrosarcome a également été mis en évidence pour la modulation de la polymérisation du collagène de type II et la régulation de la prolifération des chondrocytes.¹⁴⁰ Hamm *et al.* ont étudié l'expression génique en séquençant différents gènes codants pour des molécules de la matrice extracellulaire en fonction du site d'implantation du chondrosarcome de rat SWARM et comparativement à du cartilage sain de rat (Figure 26). Pour les chondrosarcomes SWARM se développant au niveau du tibia ou métastasés au niveau pulmonaire, COMP est peu exprimé alors qu'il l'est d'autant plus dans les tumeurs SWARM développées en sous-cutané ou même dans le cartilage sain.¹⁴¹

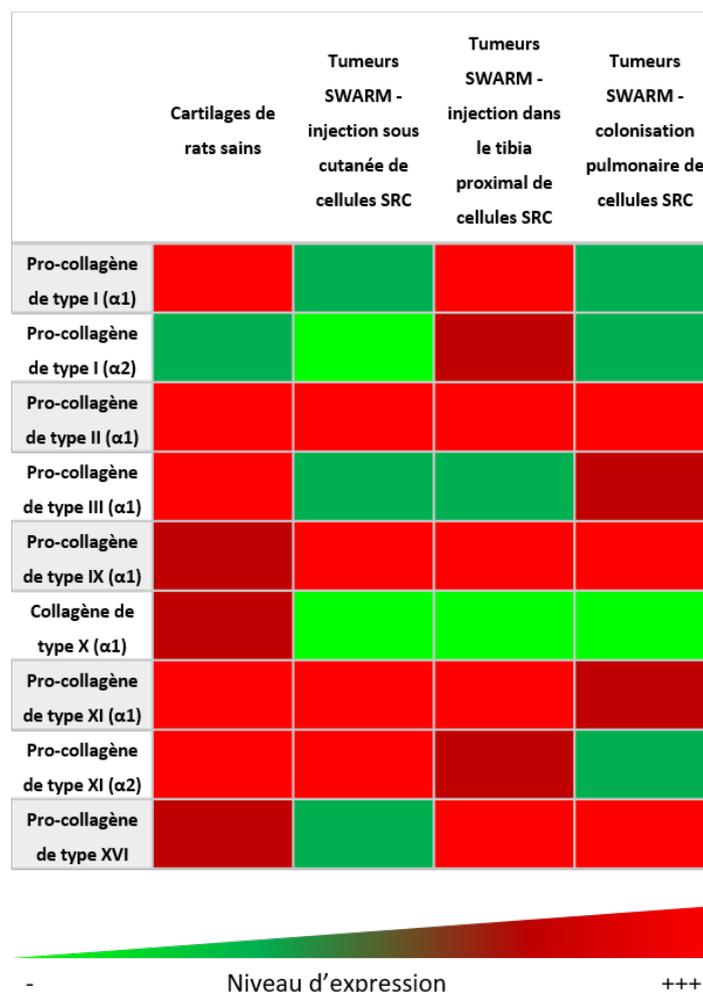


Figure 26: Niveau d'expression de gènes codants pour différents précurseurs du cartilage en fonction du lieu de développement des chondrosarcomes SWARM et par rapport au cartilage sain de rat (figure adaptée de Hamm *et al.*, 2010).¹⁴¹

2) Protéines de structure

Les protéines de structure présentes dans la matrice extracellulaire sont des glycoprotéines de taille variable qui jouent un rôle dans l'organisation entre les cellules ou entre la matrice et les cellules. Elles sont également capables de transduire des signaux cellulaires. Deux grandes familles sont retrouvées au sein de la matrice extracellulaire : les fibronectines et les laminines. Dans la littérature, très peu d'études ont été menées sur les protéines de structure présentes dans la matrice extracellulaire du chondrosarcome. En général, une analogie est faite entre la matrice extracellulaire du cartilage sain et celle du chondrosarcome. Toutefois, une publication scientifique de 1982 démontre, par immunofluorescence, la présence de fibronectine dans la matrice extracellulaire des chondrosarcomes de rat SWARM.¹⁴² Hamm *et al.*, ont également étudié l'expression de la fibronectine 1 qui est plus réduite dans le cartilage sain de rat mais aussi dans les tumeurs SWARM développées en sous-cutané alors que dans les tumeurs SWARM développées au niveau tibial ou pulmonaire, son expression est augmentée.¹⁴¹

3) Protéoglycanes

Dans les chondrosarcomes, les protéoglycanes sont des constituants clés du microenvironnement, synthétisés par les chondrocytes. Leur localisation peut être extracellulaire, au sein de la matrice, mais aussi de la lame basale, ou encore, surfacique voire intracellulaire à l'intérieur des chondrocytes. Leur position, tout comme leurs diverses fonctions, est influencée par leur constitution. Dans cette partie, un aspect général vous sera présenté tout en s'appuyant sur l'exemple d'un protéoglycane extracellulaire plus détaillé dans la littérature : l'agrécane.

i. Structure

Les protéoglycanes sont des macromolécules composées d'une partie protéique représentée par la protéine de soutien ou « core » sur laquelle vient se greffer de manière covalente des chaînes polysaccharidiques sulfatées linéaires, les GAGs (Figure 27).

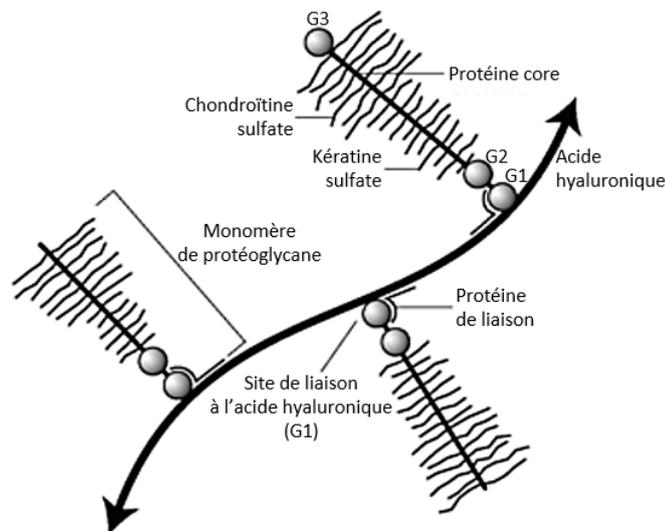


Figure 27: Structure d'un agrégat de protéoglycanes.

- Structure d'un glycosaminoglycane :

Les GAGs sont des chaînes polysaccharidiques sulfatées linéaires qui sont constituées d'unités disaccharides répétées contenant toujours un sucre aminé de type glucosamine (GlcNAc) ou galactosamine (GalNAc) et un acide uronique.

L'acide uronique possède deux isoformes : l'acide glucuronique (GlcA) et l'acide iduronique (IdoA). Il confère aux GAGs leur caractère anionique avec une charge négative portée par le groupe carboxylate et par les N- et O-sulfatations. Ces groupements ionisés sont appelés densité de charges fixes (FCD) et sont responsables d'un excès de pression interstitielle à l'intérieur de la matrice chondroïde. Cette pression est un frein « biomécanique » à la diffusion des principes actifs, et donc un élément majeur participant à la résistance thérapeutique du chondrosarcome.¹⁴³

Les GAGs peuvent être de cinq types : chondroïtine sulfate, dermatane sulfate, héparane sulfate, kératane sulfate et l'acide hyaluronique (Tableau 1). Ce dernier est le seul GAG non lié à une protéine core puisqu'il sert lui-même de support aux protéoglycanes afin de former des agrégats (Figure 27).

Tableau 1: Différentes structures de glycosaminoglycanes mettant en évidence les charges négatives portées par les unités di-saccharidiques qui les composent.

Acide hyaluronique		Acide D-glucuronique (GlcA) + D-N-acétylglucosamine (GlcNAc)
Chondroïtine sulfate		Acide D-glucuronique (GlcA) + D-N-acétylgalactosamine (GalNAc)
Dermatane sulfate		Acide D-iduronique (IdoA) + D-N-acétylgalactosamine (GalNAc)
Héparane sulfate		Acide D-glucuronique (GlcA) + D-N-acétylglucosamine (GlcNAc)
Kératane sulfate		D-galactose + D-N-acétylglucosamine (GlcNAc)

- **Structure de la protéine core :**

La protéine core possède trois principaux motifs distinctifs (Figure 28). Le premier domaine G1, situé au niveau N-terminal, est globulaire et il est responsable de l'interaction avec l'acide hyaluronique afin de former des agrégats de protéoglycanes. Un domaine interglobulaire le sépare du domaine globulaire G2. Le domaines interglobulaire est particulièrement sensible aux enzymes présentes dans la matrice extracellulaire de type agrécanases et MMPs. Le dernier domaine globulaire G3 est retrouvé au niveau de la partie C-terminale de la protéine core. Il est rattaché au domaine G2 par un nouveau domaine interglobulaire où sont ancrés les GAGs grâce à un consensus de sérine-

glycine. Il peut contenir plus d'une centaine de chaînes de chondroïtine sulfate (CS1 et CS2) et environ une trentaine de chaînes de kératane sulfate.¹⁴⁴

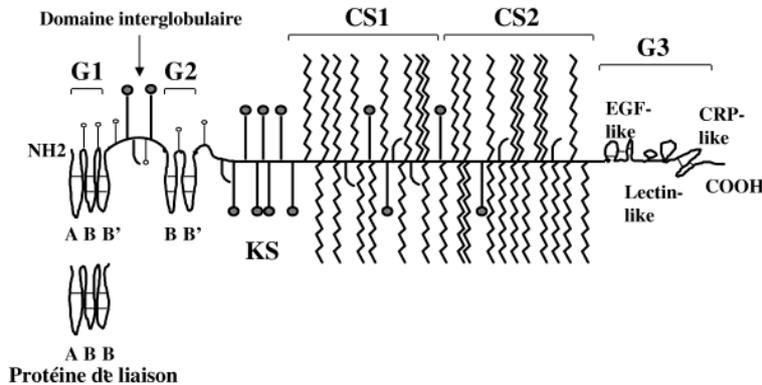


Figure 28: Structure détaillée d'un protéoglycane, ici, l'agrécane.¹⁴⁴

ii. Classification et rôles des protéoglycanes

Comme nous avons pu le voir précédemment, la composition pouvant énormément varier d'un protéoglycane à l'autre, notamment à l'intérieur d'une même famille, il est plus aisé de les classer en fonction de leur localisation au sein du microenvironnement (Figure 29).

Les protéoglycanes peuvent donc être classés en trois groupes principaux : les protéoglycanes intracellulaires comme la serglycine, les protéoglycanes de surface comme le syndécane et le glypicane, et les protéoglycanes extracellulaires tels que l'agrécane, le versicane, etc.

Nous arborerons ici, uniquement les protéoglycanes extracellulaires qui composent la matrice.

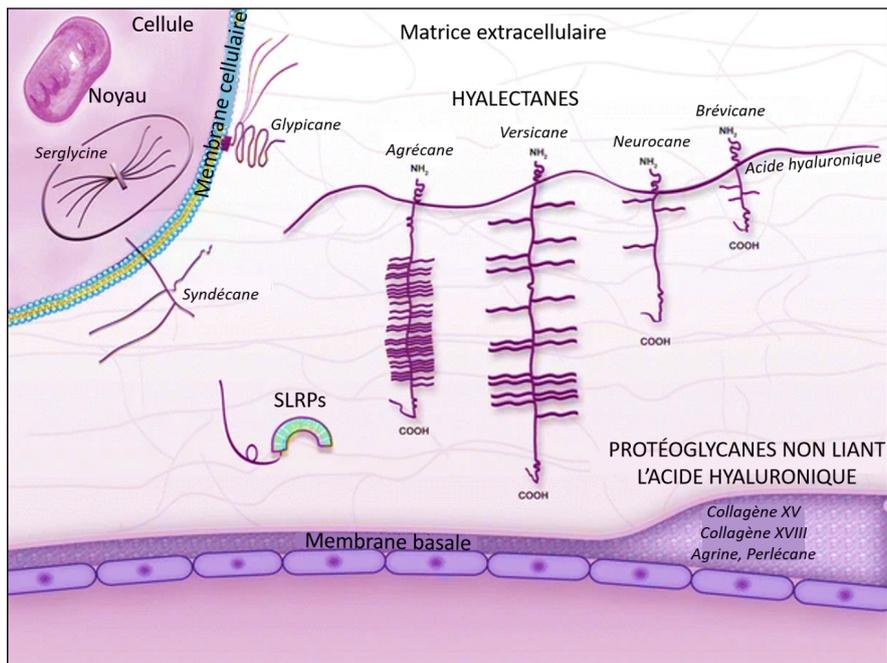


Figure 29: Classification des protéoglycanes en fonction de leur localisation.¹⁴⁵

Deux grandes familles de protéoglycanes extracellulaires sont distinguées au sein de la matrice :

- La famille des hyalectanes incluant l'agrécan, le versicane, le neurocane et le brevicane. Ces protéoglycanes possèdent une FCD plus importante que celle des autres familles, conférant à la matrice extracellulaire des propriétés hydrophiles et des capacités de déformations.¹⁴⁵
- La famille des petits protéoglycanes riches en leucine (SLRPs - Small leucine-rich Proteoglycans) possède, comme leur nom l'indique, une protéine core riche en leucine (leucine-rich repeats, LRRs). Cette famille regroupe la décorine, le biblycane et le luminanne. Leurs nombreuses leucines jouent un rôle important dans l'interaction protéine-protéine et dans la stabilité de la trame du collagène. Ils ont un impact sur la signalisation, la croissance, la survie, l'adhésion et donc la migration des cellules cancéreuses mais également sur l'inflammation et l'angiogenèse.¹⁴⁵

Au sein du microenvironnement tumoral du chondrosarcome, les protéoglycanes de la famille des hyalectanes ont été mis en évidence. La proportion de ces protéoglycanes est dépendante du stade de développement de la pathologie. En effet, l'agrécan est retrouvé de manière abondante dans la matrice extracellulaire tumorale dans des chondrosarcomes de bas grade histologique qui possèdent une matrice chondroïde alors que le versicane est quant à lui présent dans les matrices myxoïdes de chondrosarcomes de plus haut grade. Wasa *et al.* ont d'ailleurs étudié l'expression des protéoglycanes dans des prélèvements humains de chondrosarcome et dans le chondrosarcome SWARM de rat. Ils ont mis en évidence, par des techniques d'immunohistochimie, une corrélation entre le degré de malignité des tumeurs et l'expression du versicane.¹⁴⁶ Söder *et al.* ont étudié, toujours par immunohistochimie, des marqueurs susceptibles de permettre un diagnostic différentiel entre un chondroblastome, tumeur bénigne du cartilage, et un chondrosarcome à cellules claires. Alors que l'agrécan est présent dans les deux types de tumeurs, le collagène de type II est, quant à lui, absent dans les chondroblastomes mais exprimé dans les chondrosarcomes à cellules claires. Il pourrait ainsi être considéré comme un marqueur diagnostique.¹⁴⁷ De surcroît, Dornauer *et al.* se sont plus particulièrement intéressés à la matrice des chondrosarcomes humains dédifférenciés. Ils ont observé, par immunohistochimie, que l'agrécan et le collagène de type II sont, tous deux, retrouvés dans les chondrosarcomes bien différenciés, c'est-à-dire de bas grade, comme dans les chondrosarcomes dédifférenciés.¹⁴⁸

Des petits protéoglycanes riches en leucine, tels que le biglycane et la décorine, ont été mis en évidence par une étude de Wiberg *et al.* Ils permettraient de lier les fibres de collagène de type VI au sein de la matrice extracellulaire du chondrosarcome SWARM de rat.¹⁴⁹

De plus, Hamm *et al.*, toujours grâce au séquençage, ont étudié l'expression de deux gènes codant pour le biblycane et l'agrécan. Le biblycane est fortement exprimé dans le cartilage sain de rat et peu dans les tumeurs SWARM quel que soit leur site de développement. En revanche, l'agrécan

présente un important niveau d'expression dans toutes les tumeurs SWARM mais aussi dans le cartilage sain de rat.¹⁴¹

Concernant la composition en GAGs des chondrosarcomes, il a été démontré que les chondroïtines sulfates 4 et 6, l'acide hyaluronique et le kératane sulfate étaient les principaux composants des protéoglycanes de la matrice extracellulaire du chondrosarcome. L'augmentation du grade histologique du chondrosarcome n'entraîne pas de variation significative du ratio chondroïtines sulfate 4 et 6 alors qu'il y a une augmentation de la proportion de kératane sulfate au sein de la matrice extracellulaire. En revanche, la longueur des chaînes des chondroïtines sulfates 4 et 6 diminue de plus de moitié entre un chondrosarcome de grade I et III alors que celle des kératanes sulfates ne varie que très peu.¹⁵⁰

Plusieurs études sur le chondrosarcome ont mis en évidence une variation de l'acide hyaluronique dans la composition de la matrice extracellulaire comme c'est déjà le cas dans d'autres cancers.^{151,152} L'acide hyaluronique a récemment été exploré dans des prélèvements humains de fascias sains et de chondrosarcomes grâce à différentes techniques (colorimétrique, immunohistochimique et PCR en temps réel). La quantité d'acide hyaluronique était significativement plus haute dans les tissus péri-tumoraux que dans les prélèvements de fascias sains. En intratumoral, un fort immunomarquage a été également observé dans les prélèvements de chondrosarcomes comparativement aux fascias sains.¹⁵¹

4) Enzymes

Trois types d'enzymes sont retrouvées au sein de la matrice extracellulaire du chondrosarcome. Les deux premières familles sont des agrécanases et sont constituées par les ADAMs (A Disintegrin and Metalloproteinases) avec la sous-famille des ADAMTSs (A Disintegrin and Metalloproteinases with thrombospondin motifs) et les MMPs qui sont deux types de protéines protéolytiques capables de cliver les protéoglycanes de type hyaléctanes. Plus précisément, les ADAMTSs identifiées dans le chondrosarcome sont les isoformes 4 et 5 permettant de dégrader les protéoglycanes.¹²⁹ En ce qui concerne les MMPs, ce sont des collagénases permettant de dégrader le collagène de type II (MMP-1, 8 et 13), des gélatinases (MMP-2 et 9) surexprimées, de la stromélysine (MMP-3) dégradant les protéoglycanes et les glycoprotéines ou encore de la matrilysine (MMP-7) lysant la fibronectine de la matrice extracellulaire des chondrosarcomes.¹⁵³ Hamm *et al.* ont montré que la MMP-2 était plus fortement exprimée dans les tumeurs SWARM ayant métastasé au niveau des poumons alors que la MMP-13 est fortement exprimée au sein des tumeurs SWARM tibiales.

L'expression de la MMP-9 est, quant à elle, retrouvée exclusivement au niveau des tumeurs tibiales et pas pulmonaires ou sous-cutanées.¹⁴¹

Afin de réguler l'action protéolytique des enzymes, les TIMPs (Tissue inhibitor of metalloproteinases) 1, 2 et 3 ont également été retrouvées au sein de la matrice du chondrosarcome, permettant, ainsi, d'inhiber les MMPs.¹²⁹

Après avoir traité la composante matricielle du microenvironnement tumoral, il semble pertinent d'aborder, à une échelle plus large, l'environnement osseux dans lequel les chondrosarcomes squelettiques se développent.

D) Interactions entre le chondrosarcome et l'os

L'invasion de l'os par une cellule tumorale de chondrosarcome affecte l'équilibre du remodelage osseux. Le rôle clé de l'environnement osseux dans le développement des chondrosarcomes a été suspecté, il y a de nombreuses années. En effet, un modèle de chondrosarcome implanté en intra-osseux chez le rat a été développé afin de simuler la progression du chondrosarcome humain et de pouvoir évaluer les interactions entre l'environnement osseux et le chondrosarcome.¹⁵⁴ L'implantation d'un chondrosarcome dans la moelle osseuse ou en contact étroit avec l'os, dont le périoste a été préalablement cureté, entraîne un remodelage osseux. En revanche, l'implantation d'un chondrosarcome, en contact étroit avec l'os, mais sans lésion du périoste préalable, n'a aucun effet sur l'os. Cela suggère que les facteurs libérés lors de la cicatrisation osseuse interagissent avec le développement tumoral. De plus, les tumeurs qui se sont développées en milieu intramédullaire, présentent différents foyers avec des gradations variées confirmant que le milieu osseux est un facteur important dans la pathogenèse du chondrosarcome (Figure 30).¹⁵⁴ Une revue a notamment mis en évidence la présence de nombreux types cellulaires au sein de la niche osseuse qui sont donc en contact étroit avec les cellules tumorales. Il peut s'agir d'ostéoblastes et d'ostéoclastes mais également de macrophages, de lymphocytes, de cellules endothéliales ou encore de cellules souches hématopoïétiques.¹⁵⁵

Lorsqu'un chondrosarcome est central ou primaire et qu'il se développe dans l'espace médullaire de l'os, ses cellules tumorales induisent un dérèglement de l'équilibre entre ostéoblastes et ostéoclastes afin d'activer la résorption osseuse de l'os trabéculaire. Lorsqu'un chondrosarcome est périphérique ou secondaire, il se développe à partir de la surface osseuse. La masse tumorale interagit donc avec le périoste qui mime la « niche osseuse » puisqu'il est en réalité une membrane continue recouvrant l'os, vascularisée et contenant des cellules ostéoprogénitrices dont des cellules souches mésenchymateuses. La pénétration des cellules tumorales des chondrosarcomes périphériques dans

le tissu osseux est également associée à l'activation de la résorption osseuse induite par la formation d'ostéoclastes.

Ainsi, les chondrosarcomes centraux et périphériques interagissent avec un microenvironnement osseux similaire.^{154,155}

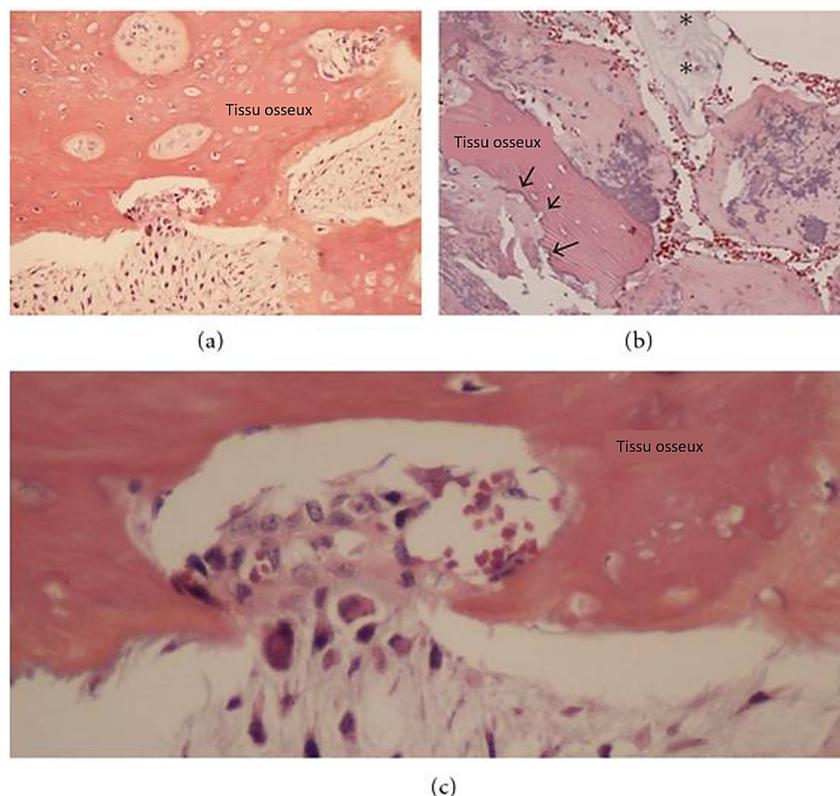


Figure 30: Mise en évidence histologique de l'interaction entre le chondrosarcome et l'os.¹⁵⁵

Coloration à l'hématoxyline et éosine, objectifs ($\times 20$: a et b ; $\times 40$: c). Infiltration de cellules de chondrosarcome dans le tissu osseux (a-c). Le développement du chondrosarcome est associé à des foyers de résorption osseuse (b). Flèches : zone de résorption osseuse et * : partie proliférative.

Le lien entre le chondrosarcome et son environnement osseux a été aussi étudié d'un point de vue moléculaire. En effet, l'expression de SOX9 a été retrouvée dans des prélèvements de chondrosarcomes humains. Cela suggère que l'origine de ces tumeurs proviendrait de cellules souches multipotentes présentes au sein de la niche osseuse qui se seraient engagées dans une voie de différenciation chondrogénique.¹⁵⁶ Une étude a également démontré que la chimiokine inflammatoire CCL5, produite par les lymphocytes T eux aussi présents au sein de la niche osseuse, augmente l'expression de la MMP-3 et donc le pouvoir migratoire des cellules de chondrosarcome humain JJ012.¹⁵⁷ De même, l'ostéopontine localisée dans la matrice osseuse augmente l'expression de MMP-9 et donc la migration des cellules JJ012.¹⁵⁸ RANKL participe à l'activation des ostéoclastes et est considéré comme un facteur pro-résorption osseuse. Une étude a d'ailleurs montré que l'expression de RANKL dans les tissus de chondrosarcomes humains était plus élevée que celle dans le cartilage sain et que RANKL augmentait, *in vitro*, la migration des cellules JJ012.¹⁵⁹ Enfin, les cytokines pro

inflammatoires IL-1 et TNF- α et TNF- β (Tumeur necrosis factor), ainsi que les différents facteurs de croissance, présents dans cet environnement osseux, jouent un rôle tout aussi important en favorisant la production d'ostéoclastes et en réduisant la formation osseuse afin de faciliter le développement tumoral.¹⁶⁰

Toutes ces études montrent ainsi le caractère essentiel de la niche osseuse dans le soutien de la croissance et de l'invasion tumorale.

Les composantes cellulaires et matricielles du microenvironnement tumoral font l'objet de plus en plus d'études. Une meilleure caractérisation de leurs interactions avec les cellules tumorales, qu'elles soient directes ou indirectes, permettrait d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin de contourner des mécanismes de résistance thérapeutique. Dans cette prochaine partie, nous aborderons les différentes stratégies diagnostiques et thérapeutiques exploitant les caractéristiques du microenvironnement tumoral du chondrosarcome.

III) Les stratégies d'imagerie diagnostique et les approches thérapeutiques exploitant le microenvironnement tumoral

A) Présentations des imageries fonctionnelles

Alors que les techniques d'imageries anatomiques telles que la radiographie, le scanner et l'IRM de routine fournissent des informations relatives à la taille, la localisation et l'architecture tumorale avec un haut niveau de résolution, l'imagerie fonctionnelle va permettre d'accéder aux processus cellulaires, moléculaires, tissulaires impliqués dans ces pathologies.

1) Imagerie nucléaire

L'imagerie nucléaire exploite des radioisotopes utilisés pour cibler une molécule ou un système biologique et suivre son devenir *in vivo*. À la suite de l'administration de radio-pharmaceutiques spécifiques, l'imagerie nucléaire permet d'accéder *in vivo* à des informations quantitatives, relatives à l'activité métabolique, moléculaire et fonctionnelle de l'organe et/ou de la cible. Elle permet également d'accéder à des remaniements lors de l'évolution de la pathologie et de suivre une réponse thérapeutique. Les radio-pharmaceutiques exploités en imagerie nucléaire sont soit des radionucléides seuls, soit une association entre un radionucléide et une molécule servant à son transport et possédant une forte affinité pour la cible d'intérêt.

L'imagerie nucléaire sera de deux types en fonction de l'isotope radioactif utilisé : nous parlerons de tomographie d'émission monophotonique (TEMP) pour la détection du signal émis par

les isotopes émetteurs gamma, tels que le technétium métastable 99, et de TEP pour l'imagerie exploitant les radioisotopes émetteurs β^+ , tels que le fluor 18.

2) IRM CEST

Cette partie est volontairement plus développée que celle portant sur l'imagerie nucléaire puisqu'au cours de ce travail de thèse, de nombreuses optimisations ont été nécessaires afin de pouvoir exploiter le potentiel de cette méthode d'imagerie.

Le CEST est une approche basée sur le transfert d'aimantation entre les protons d'une fonction chimique d'intérêt et les protons de l'eau libre présents dans le milieu. La première expérience CEST peut être attribuée à Forsén et Hoffman qui, en 1963, mesurèrent, à l'aide d'impulsions de saturation, des constantes d'échange dans plusieurs systèmes.¹⁶¹ Un des premiers spectres de saturation, aussi appelé spectre Z, fut produit en 1989 par Balaban et Wolff *in vivo* sur des reins de lapin et *ex vivo* sur du tissu cardiaque canin.¹⁶² Depuis le début des années 2000, le CEST est devenu une méthode de choix en IRM grâce à ses nombreuses applications *in vivo*.^{163,164}

i. Principe de l'IRM CEST

L'originalité de la méthode CEST réside dans l'observation des protons des molécules d'eau, présents en très fortes concentrations dans les tissus biologiques, pour imager indirectement un métabolite d'intérêt présent à des concentrations environ 4 ordres de grandeur plus faibles grâce aux échanges chimiques qui existent entre ces deux populations. Une illustration schématique est proposée dans la partie supérieure de la Figure 31. Le principe de l'IRM CEST peut être décrit de la manière suivante.

Dans un premier temps, les protons échangeables de la fonction chimique d'intérêt sont sélectivement saturés (Figure 31, étape 1), permettant d'égaliser les deux populations de ces protons sur leurs deux niveaux d'énergie. Cette saturation sélective des protons de la fonction chimique d'intérêt permet de les rendre « invisibles » d'un point de vue IRM. Si un proton saturé de la fonction d'intérêt vient s'échanger avec un proton non saturé de l'eau, le proton non saturé arrivant sur la fonction d'intérêt pourra être, à son tour, saturé et sera prêt pour un prochain transfert sur une molécule d'eau. Ainsi, si la saturation est appliquée pendant une durée suffisante, la quantité de protons saturés sur les molécules d'eau sera suffisante pour observer une diminution de l'intensité de son signal. Cette diminution est l'effet ou le contraste CEST (Figure 31, étape 2). Pour quantifier cet effet CEST, l'intensité du signal RMN (Résonance magnétique nucléaire) est en général mesurée à plusieurs fréquences pour obtenir le spectre Z. Ce spectre représente l'intensité du signal de l'eau en fonction de la fréquence de saturation.¹⁶⁵ Sur le spectre Z (Figure 31, étape 3), un signal proche de 0

est observé pour une fréquence de 0 ppm. Par convention, cette fréquence correspond à la fréquence de résonance de l'eau. Autour de cette fréquence centrale de 0 ppm, la diminution de l'intensité du signal correspond à la saturation directe de l'eau. À 1 ppm, une atténuation supplémentaire du signal est observée correspondant à l'effet CEST des fonctions hydroxyles.

L'IRM CEST enregistrera donc une image des protons des molécules d'eau qui sera pondérée par l'échange chimique avec les protons de la fonction d'intérêt, ici, les hydroxyles.

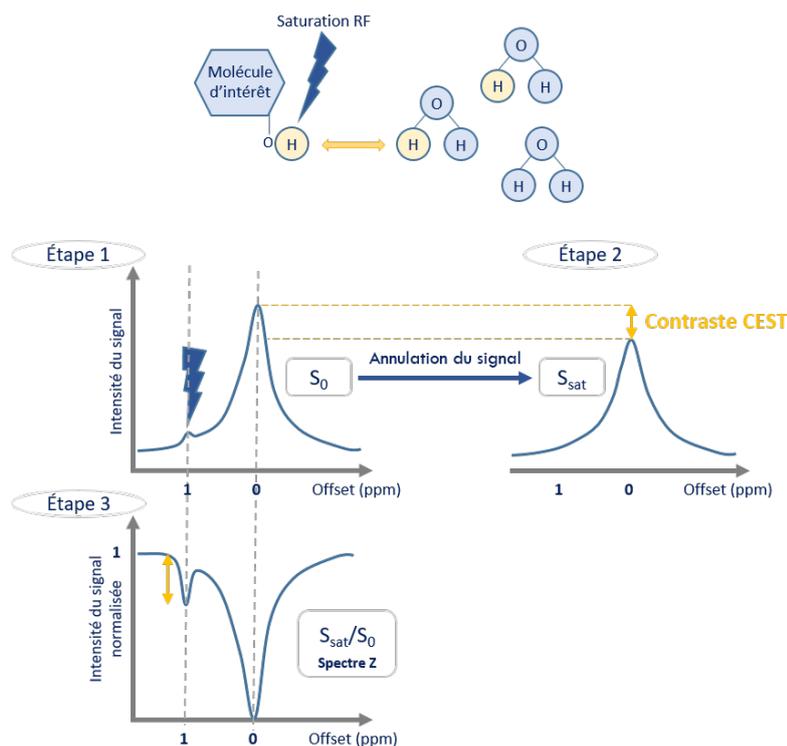


Figure 31: Principe de l'IRM CEST.

Pour obtenir un transfert de saturation efficace, deux conditions sont nécessaires. Premièrement, la constante d'échange chimique (k_{ex}) de la fonction étudiée doit être du même ordre de grandeur ou inférieure à l'écart entre les fréquences de résonance des deux populations en échange ($\Delta\omega$). Cette condition montre l'intérêt de réaliser des expériences CEST sur des imageurs ayant un champ magnétique principal B_0^d élevé. En effet, en augmentant le B_0 l'écart des fréquences $\Delta\omega$ entre la fonction et le métabolite (en Hz) augmentera tandis que la vitesse d'échange k_{ex} restera constante. Une gamme plus large de vitesse d'échange pourra donc être investiguée. Deuxièmement, la constante d'échange k_{ex} doit être également supérieure au temps de relaxation longitudinal T_1 des protons du soluté pour assurer un temps suffisant d'échange avant une relaxation complète des spins.¹⁶⁶

ii. Facteurs pouvant influencer l'effet CEST

^d B_0 correspond à l'intensité du champ magnétique de l'aimant présent dans l'imageur, il est exprimé en Tesla (T).

Au cours de l'acquisition, l'expérimentateur doit définir plusieurs paramètres pour lancer la séquence CEST dont la durée et l'intensité de la saturation radiofréquence. La durée de la saturation doit être choisie par rapport à la constante d'échange k_{ex} des fonctions chimiques d'intérêt. Elle doit être assez longue pour que l'état d'équilibre soit atteint au cours de la saturation. L'intensité de la saturation radiofréquence, soit la valeur de B_1^e de l'impulsion de saturation, doit également être optimisée. En effet, un B_1 trop élevé aura tendance à élargir les effets CEST visibles sur le spectre Z. Le risque est de ne plus pouvoir distinguer deux effets CEST à des fréquences proches. À l'inverse, une valeur trop faible de B_1 pourra ne pas faire apparaître des effets CEST peu intenses.¹⁶⁷ D'autres facteurs extrinsèques tels que la température, le pH et la concentration de la fonction d'intérêt dans l'échantillon influencent l'effet CEST.¹⁶⁸

Au niveau intrinsèque, donc propre à l'équipement, il a été montré que les inhomogénéités des champs B_0 et B_1 ont un impact sur la quantification. Pour mesurer la fréquence du B_0 dans chaque pixel de l'image, une séquence peut être acquise séparément de la séquence CEST, en utilisant un balayage à faible intensité de saturation avec des décalages de fréquences étroitement centrés sur la résonance de l'eau. Cette technique est connue sous le nom de WASSR (water saturation shift referencing) et permet de corriger les inhomogénéités du champs B_0 .¹⁶⁹ Une nouvelle technique nommée WASABI a été publiée en 2017 et permet de cartographier, de manière simultanée, les inhomogénéités des champs magnétiques B_0 et B_1 .¹⁷⁰

iii. Quantification du contraste CEST

Le CEST peut être considéré comme un contraste appartenant à la famille des contrastes par transfert d'aimantation (MTCs). Un des principaux enjeux pour la quantification du contraste CEST est donc de parvenir à évaluer les contributions des différents transferts d'aimantation au signal enregistré mais aussi celle de la saturation directe (DS) de l'eau sur le spectre Z. Dans un milieu complexe tel que retrouvé *in vivo*, les différents contrastes de transferts d'aimantation observables peuvent provenir de macromolécules semi-solides ou immobiles (MTC_{IM}) ou bien de macromolécules mobiles (MTC_{MM}). En effet, les protons de certaines macromolécules peuvent transférer leur aimantation vers ceux de l'eau ayant alors un effet similaire à celui de l'effet CEST mais grâce à d'autres mécanismes d'échanges. Dans le contraste CEST, l'échange chimique est réalisé grâce soit à des métabolites (glucose, créatine par exemple) soit à des macromolécules mobiles (GAG, protéines).¹⁷¹

^e B_1 correspond à l'intensité de saturation de l'impulsion radiofréquence, il est exprimé généralement en mT ou en μT .

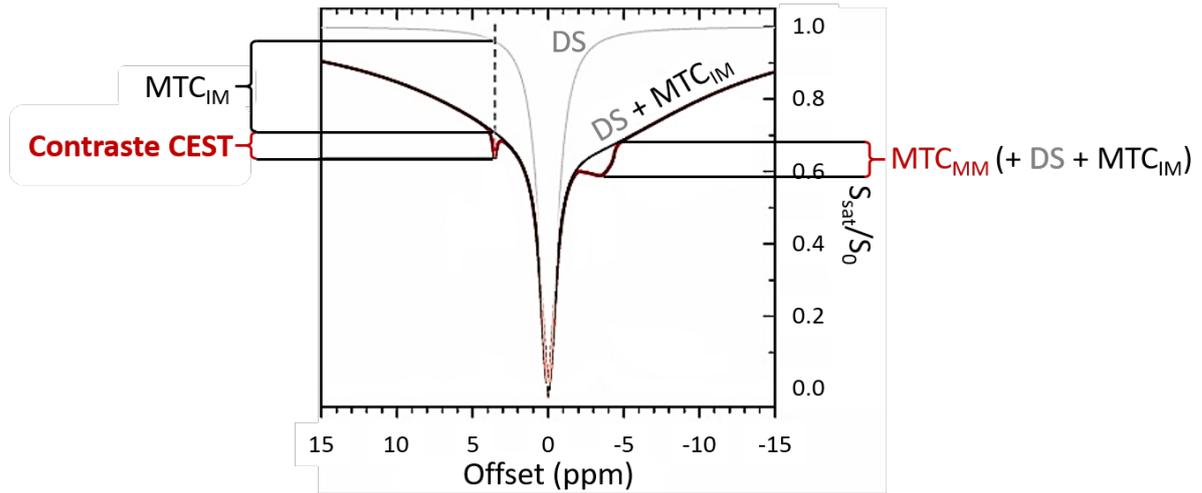


Figure 32: Spectres Z schématiques représentant l'effet de la saturation directe de l'eau et des différents contrastes de transfert d'aimantation.¹⁷²

Spectre Z avec uniquement l'effet de la DS de l'eau en gris, spectre Z avec l'effet de la DS et du contraste de transfert d'aimantation des macromolécules semi-solides ou immobiles (MTC_{IM}) en noir, et spectre Z avec l'effet de la DS, du MTC_{IM} , du contraste de transfert d'aimantation des macromolécules mobiles (MTC_{MM}) et du contraste des échanges chimiques (CEST) en rouge.

La saturation directe de l'eau et la majorité des MTCs sont symétriques par rapport à la fréquence de résonance de l'eau. À l'inverse, l'effet CEST lui ne se produit que pour des fréquences de saturation positive. Ainsi, les effets symétriques peuvent être supprimés en faisant la différence de leurs intensités de signaux pour une même valeur absolue de fréquence de part et d'autre de la fréquence de résonance de l'eau arbitrairement placée à 0 ppm. De ce fait, seuls les effets dus à l'échange chimique seront mesurés. Cette approche décrit l'idée d'une analyse par asymétrie et est la première à avoir été proposée pour la quantification de l'effet CEST. Elle se résume par la formule :

$$MTR_{asym} = \frac{[S(-\Delta\omega) - S(+\Delta\omega)]}{S_0} \quad (1)$$

où S_0 fait référence à l'intensité du signal de l'eau saturée à une fréquence très éloignée de celle de l'eau et $S(+\Delta\omega)$ et $S(-\Delta\omega)$ font référence aux intensités du signal qui sont obtenues après l'application d'une saturation à une fréquence de $\pm \Delta\omega$.¹⁷³

Cependant, les effets nucléaires Overhauser (NOEs), principalement observés dans les MTC_{MM} , sont eux aussi non symétriques par rapport à la fréquence de résonance de l'eau et apparaissent seulement à des fréquences négatives du spectre Z.^{171,174} Ainsi, l'hypothèse de symétrie considérée dans l'approche par MTR_{asym} n'est pas validée. Utiliser cette approche alors qu'il existe des MTC_{MM} entraîne la mesure d'un effet CEST également pondéré par d'autres MTC_{MM} . Il est donc nécessaire de disposer d'autres méthodes d'analyse.^{166,175}

De nouvelles approches ont donc été développées pour ne mesurer que l'effet de l'échange chimique. Zaiss *et al.* ont proposé de quantifier l'effet CEST grâce à un ratio de transfert d'aimantation

(MTR) de la relaxation dépendant de la constante d'échange dans le repère tournant (R_{ex}) : le $MTR_{R_{ex}}$.¹⁷⁶ Cette grandeur présente l'avantage, par rapport au MTR_{asym} , de ne dépendre, ni de la relaxation T_1 , ni des transferts d'aimantation des macromolécules immobiles (symétriques par rapport à la fréquence de résonance de l'eau). Cette grandeur est calculée à partir de l'expression suivante :

$$MTR_{R_{ex}} = \frac{1}{S(+\Delta\omega)} - \frac{1}{S(-\Delta\omega)} = \frac{R_{ex}}{\cos^2 \theta \times R_{1a}} \quad (2)$$

Avec θ et R_{1a} qui sont, respectivement, l'angle de bascule du train de saturation et la constante de relaxation longitudinale de l'eau. Il est possible de rendre le $MTR_{R_{ex}}$ uniquement dépendant des paramètres d'échange par la méthode de relaxation apparente échange-dépendante (AREX) :

$$AREX = MTR_{R_{ex}} \times R_{1a} \quad (3)$$

Dans une idée proche, le traitement QUASS CEST « Quasi-steady-state CEST » proposé par Phillip Zhe Sun permet de remonter à l'effet CEST à l'équilibre de saturation en prenant en compte les limitations des impulsions de saturation avec leur durée définie mais aussi les phénomènes de relaxation.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ Il est important de noter, aussi bien pour l'approche AREX que pour l'approche QUASS CEST, que des données complémentaires obtenues durant l'acquisition, notamment le R_{1a} , sont nécessaires. Ceci se traduit par des durées de protocoles plus importantes, ce qui peut être une limitation.

Une autre approche est la méthode des 3 points détaillée par Jin *et al*, qui consiste à repérer sur le spectre Z, les deux fréquences limites de l'effet CEST (flèches cyan sur la Figure 33) et une 3^{ème} fréquence correspondant au pic de l'effet CEST (flèches oranges sur la Figure 33).

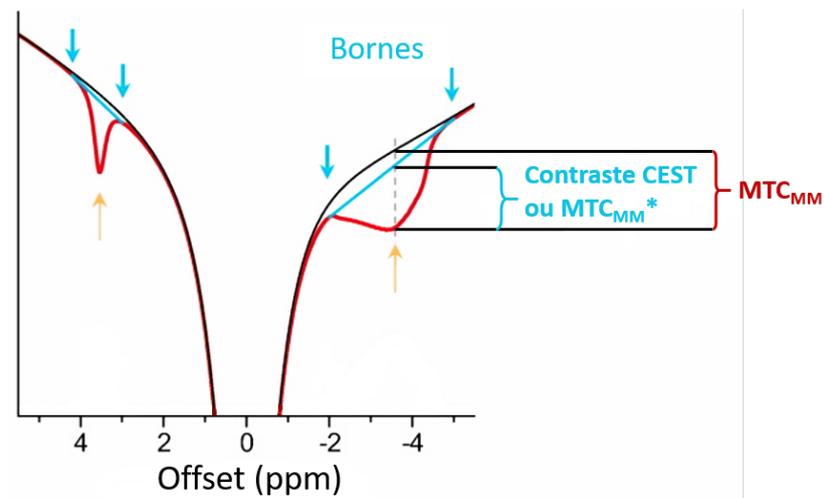


Figure 33: Approche quantitative de l'effet CEST par la méthode des 3 points.¹⁷²

Entre les fréquences minimum et maximum de l'effet CEST, sera tracée, une fonction linéaire (ligne cyan sur la Figure 33). Le contraste CEST (ou MTC_{MM}^*) correspondra à l'intensité sous la droite cyan de la Figure 33, calculé en utilisant la formule :

$$MTC_{MM}^* = \left\{ \frac{[S(\omega - \Delta) + S(\omega + \Delta)]}{2} - S(\omega) \right\} / S_0 \quad (4)$$

où S_0 fait référence à l'intensité du signal de l'eau saturée à une fréquence très éloignée et $S(\omega + \Delta)$ et $S(\omega - \Delta)$ font référence aux intensités du signal au niveau des bornes minimum et maximum de l'effet CEST, respectivement. $S(\omega)$ correspond, quant à lui, à l'intensité du signal au niveau de la fréquence du pic de l'effet CEST. L'hypothèse dans cette approche est qu'entre les deux points extrêmes de l'effet CEST, une ligne droite estime correctement l'ensemble des effets de transferts d'aimantation autres que ceux dus à l'échange chimique.¹⁷²

Les autres approches passent par des étapes de modélisation d'un ou plusieurs effets de transfert d'aimantation. La saturation directe de l'eau étant toujours présente dans les spectres Z, il est possible de la modéliser à l'aide d'une fonction Lorentzienne puis de soustraire cette atténuation due au signal de l'eau pour obtenir un spectre Z indépendant de la saturation de l'eau : c'est l'approche par différence lorentzienne (LD).¹⁸⁰ Afin de s'affranchir des MTC_{IM} , qui sont symétriques par rapport à la fréquence de résonance de l'eau, ceux-ci peuvent également être simulés pour, qu'une fois soustraits au spectre Z expérimental, les seuls effets de transfert d'aimantation restant soient dus à l'échange chimique ou aux macromolécules mobiles. C'est le principe de l'approche EMR (Extrapolated semisolid magnetization transfer reference) ou de l'ajustement LD décrit par Zhang *et al.*^{181,182} Enfin, il est possible de simuler une partie ou la totalité du spectre Z en créant un modèle contenant les différentes populations de protons étudiés (5 ou 6 en général) présentant des transferts d'aimantation. Les spectres Z sont alors simulés soit à partir des équations de Bloch-McConnell, soit par à un ajustement avec de multiples fonctions Lorentziennes.¹⁸³⁻¹⁸⁵ Dans cette dernière approche, puisque les transferts d'intérêt sont simulés, leur intensité est directement extraite du modèle. Il est, en général, admis que pour des données *in vivo*, les fonctions Lorentziennes décrivent correctement les phénomènes observés. Il est à noter qu'un papier propose également de modéliser les transferts d'aimantation par une fonction Gaussienne-Lorentzienne.¹⁸²

Au cours de ce travail de thèse, nous avons optimisé de nombreuses méthodes de quantifications du contraste CEST. Nous avons décidé d'utiliser un ajustement Lorentzien pour les fonctions chimiques étudiées qui résonnent à une fréquence proche de celle de l'eau et pour les fonctions un peu plus éloignées, nous avons choisi une analyse par la méthode des 3 points, décrite par Jin *et al.*¹⁷²

Une fois la valeur de l'effet CEST quantifiée pour chaque voxel d'une région d'intérêt, des cartes colorimétriques sont générées. Elles représentent l'intensité de l'effet CEST de chaque voxel et sont généralement superposées à des images anatomiques, permettant ainsi, une meilleure interprétation.

iv. Fonctions d'intérêt étudiées par l'IRM CEST pour l'oncologie clinique

Toutes les fonctions possédant des protons échangeables sont susceptibles d'être visualisées par IRM CEST mais, pour rester dans le domaine de la cancérologie, les principales fonctions étudiées sont les hydroxyles, les amines et les amides. Depuis le premier essai clinique faisant appel à de l'IRM CEST en 2012, 16 autres ont été déposés dans le domaine de l'oncologie.

L'IRM CEST peut étudier des fonctions possédant des protons échangeables endogènes à l'organisme ou bien des fonctions exogènes.¹⁷⁵ Les effets CEST peuvent être classés en deux grands groupes :

- Les agents CEST diamagnétiques (diaCEST) regroupent des fonctions possédant des protons échangeables n'impliquant pas d'ions métalliques et résonnants entre 0 et 6 ppm. La grande majorité des agents diaCEST est endogène et ne nécessite donc pas d'injection.¹⁶⁵
- Les agents CEST paramagnétiques (paraCEST) impliquent des ions métalliques et, par conséquent, sont généralement éloignés de l'eau en résonnant au-delà de 6 ppm. Les agents paraCEST sont généralement exogènes, ils doivent être administrés par injection et sont également associés à une toxicité potentielle due aux ions métalliques qu'ils possèdent.¹⁶⁵

Au cours de ma thèse, puisque nous avons utilisé différentes techniques d'imagerie, nous nous sommes concentrés sur la méthode CEST la moins invasive donc celle portant sur les agents diaCEST. Quelques exemples d'applications vous sont présentés ci-dessous.

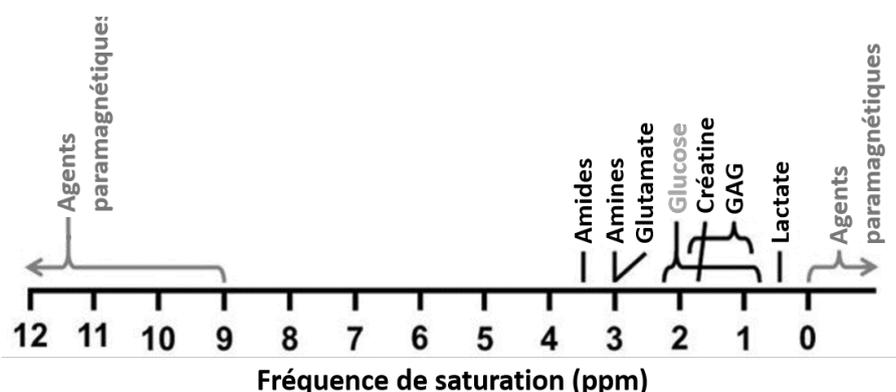


Figure 34: Fréquences de résonance des différents métabolites ou fonctions visibles par IRM CEST.

- Fonctions hydroxyles

Elles résonnent autour d'une fréquence de 1 ppm et peuvent aller de 0,4 à 2,2 ppm environ. Les molécules riches en protons hydroxyles échangeables sont, par exemple, les glycanes qui constituent les glycoaminoglycanes¹⁸⁶, le glycogène¹⁸⁷, les glycoprotéines¹⁸⁸ mais aussi le glucose.

- Le glucose (glucoCEST)

La concentration de glucose endogène est relativement faible dans l'organisme. Pour cette raison, le glucoCEST surveille l'absorption dynamique et l'élimination, au sein des tumeurs, d'un dérivé naturel du glucose exogène, le D-glucose. C'est un agent de contraste diaCEST cliniquement approuvé par la « *food and drug administration* » et qui peut générer un large effet CEST grâce à ses cinq groupements hydroxyles résonnant entre 0,8 et 2,2 ppm. Ce contraste nécessite tout de même de réaliser deux imageries en pré- et post-injection, ce qui rallonge dramatiquement le temps d'acquisition. Le glucoCEST a été étudié avec succès sur des modèles tumoraux précliniques tels que le cancer colorectal, le cancer du sein et le gliome¹⁸⁹⁻¹⁹¹ mais aussi, en clinique sur des patients atteints de gliomes ou de cancers oto-rhino-laryngologiques (ORL).¹⁹²⁻¹⁹⁴

- Le lactate (LATEST)

La formation de lactate résulte du métabolisme du glucose lorsque l'oxygénation du tissu est insuffisante et c'est notamment le cas dans le muscle au cours d'efforts physiques intenses. Le lactate possède des fonctions hydroxyles visualisables par IRM CEST en appliquant une saturation à 0,4 ppm. Le LATEST (Lactate chemical exchange saturation transfer) a fait l'objet de deux études de faisabilité en 2016 et en 2022 sur des volontaires sains afin d'estimer le taux d'accumulation d'acide lactique dans leurs muscles squelettiques avant et après un effort physique.^{195,196} Radke *et al.* ont réussi à observer à 3T, une augmentation temporaire de la concentration de lactate dans le muscle après l'exercice.¹⁹⁶ L'étude de DeBrosse *et al.* a montré une corrélation entre les résultats d'IRM CEST et ceux obtenus par des techniques de spectroscopie.¹⁹⁵ Au cours de cette même étude, une concentration élevée de pyruvate a été administrée à des souris porteuses d'un lymphome afin de stimuler rapidement la conversion métabolique de l'excès de pyruvate en lactate. L'IRM CEST réalisé avant et après a permis de détecter cette conversion.¹⁹⁵ Bien que ces résultats soient prometteurs, ils nécessitent d'être appuyés par d'autres études afin de vérifier l'innocuité d'une injection de pyruvate concentrée et de confirmer sa nécessité pour étudier le niveau du métabolisme glycolytique dans les tumeurs hypoxiques.

- Les glycosaminoglycanes (gagCEST)

Une molécule de GAG comme la chondroïtine sulfate contient un groupement –NH pour trois groupements –OH pouvant être détectés par IRM CEST (Figure 35).

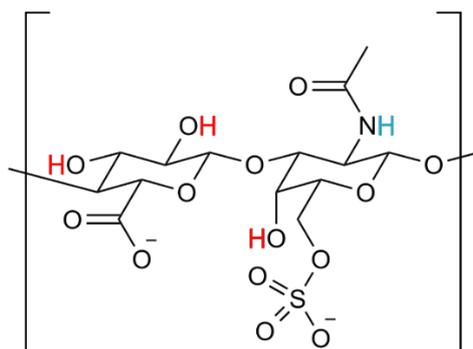


Figure 35: Mise en évidence des protons échangeables de la chondroïtine sulfate susceptibles d'être détectés par IRM CEST.

La technique gagCEST a été développée par Ling *et al.* en 2008 pour cartographier le contenu en GAG *in vivo*.¹⁹⁷ Cette technique est considérée comme une méthode très sensible pour l'évaluation de la teneur en GAGs dans le cartilage articulaire et dans les disques intervertébraux des patients. Le gagCEST s'est révélé prometteur pour le diagnostic de l'arthrose du genou (Figure 36a). En effet, les cartes gagCEST du cartilage rotulien d'un patient âgé de 65 ans souffrant de douleurs au genou ont montré des valeurs plus faibles d'effet CEST que chez un sujet volontaire jeune.¹⁹⁸ Un autre exemple chez un patient de 41 ans où une diminution de l'effet CEST est observée dans le 5^{ème} disque intervertébral lombaire (Figure 36b). Cette diminution est corrélée avec une augmentation du score de Pfirrmann marquant la dégénérescence discale.¹⁹⁹

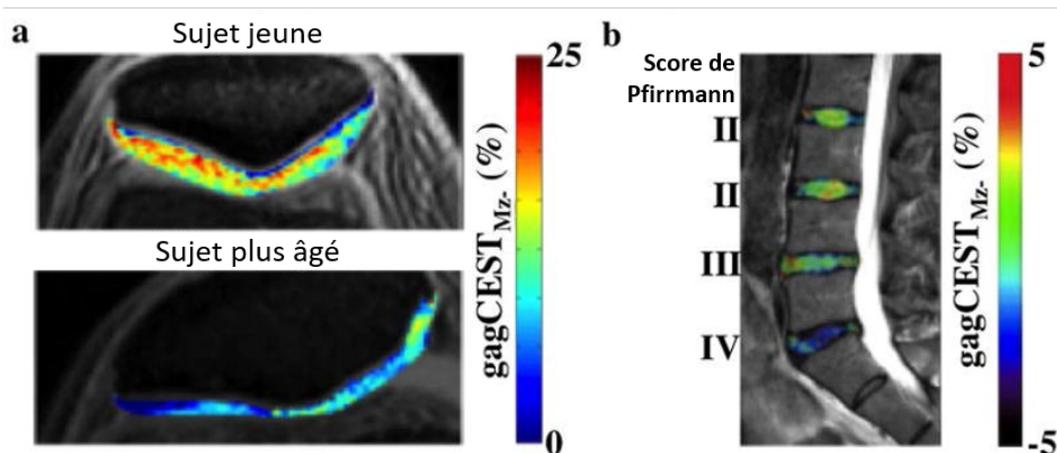


Figure 36: Superposition de cartes gagCEST avec des IRM anatomiques du genou (a) et de la colonne vertébrale (b).^{198,199}

Acquisitions réalisées à 7 et 3 T, respectivement.

Malgré les applications pathologiques du gagCEST en clinique, peu d'études portent actuellement sur l'utilisation de ce contraste en oncologie. Deux études ont notamment permis

d'évaluer la forte teneur en protéoglycanes d'une tumeur du pancréas dans un modèle préclinique. La première étude met en évidence une corrélation positive entre le volume tumoral et le signal gagCEST *in vivo* mais également une corrélation positive entre la quantification de l'immunohistochimie ciblant l'acide hyaluronique *ex vivo* et le signal de gagCEST *in vivo*.²⁰⁰ Dans la seconde étude, trois modèles animaux de cancer du pancréas sont développés : un sous-cutané, un orthotopique et un génétique. Après un traitement par ultrasons focalisés sur la tumeur, les auteurs observent une diminution des valeurs moyennes intratumorales de gagCEST et de T_2 pour le modèle génétique et une augmentation des valeurs d'ADC (Apparent diffusion coefficient) pour les 3 modèles. L'immunohistochimie de l'acide hyaluronique montre une plus faible intensité dans les tumeurs traitées que dans les tumeurs contrôles et ce dans les 3 modèles. De plus, une corrélation positive entre la concentration tumorale en acide hyaluronique et la mesure de gagCEST a été observée pour les tumeurs traitées et contrôles du modèle orthotopique et les tumeurs traitées du modèle génétique.²⁰¹

- **Fonctions amines**

Elles possèdent une fréquence de résonance s'étalant de 1,5 à 3,2 ppm environ.

- Les protons guanidyles (guanidylCEST)

Les protons guanidyles résonnent autour de 2 ppm et sont abondants au niveau des chaînes latérales des protéines et peptides cytoplasmiques.²⁰² Ils sont également sensibles aux variations de pH qui affectent leur vitesse d'échange chimique avec l'eau. En effet, une acidification de l'environnement tumoral entrainera une diminution de leur vitesse d'échange avec les protons de l'eau et donc une augmentation du contraste guanidylCEST.²⁰² Plusieurs études précliniques et cliniques ont montré la pertinence de réaliser un ratio signal des amides sur celui des guanidyles pour l'étude du pH intracellulaire des cellules tumorales (Figure 37).²⁰²⁻²⁰⁴

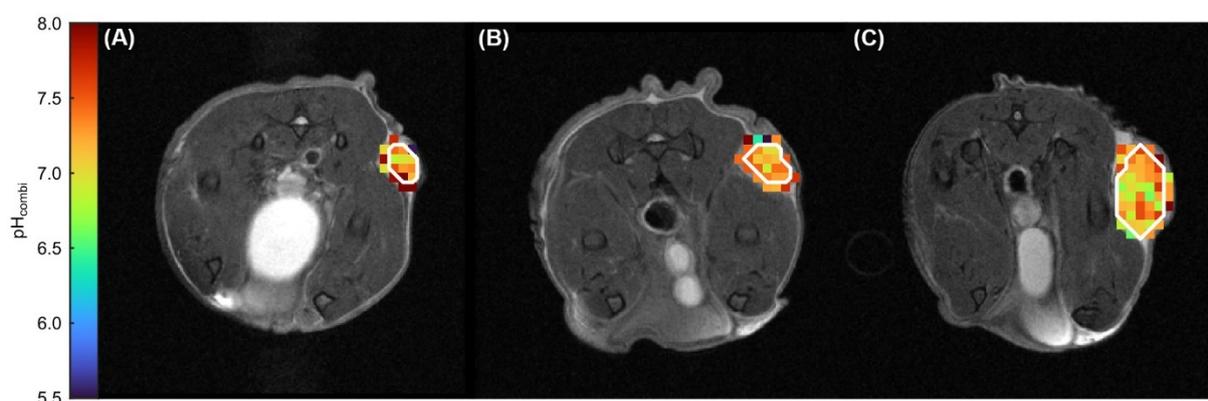


Figure 37: Superposition de cartes de pH obtenues à l'aide des contrastes guanidyles et des amides avec coupes axiales anatomiques de souris xénogreffées avec des cellules humaines de cancer du côlon en sous-cutané au niveau du flanc.²⁰³

(A) Tumeur de petite taille, (B) Tumeur de taille moyenne, (C) Tumeur de grande taille.

- La créatine (CrCEST)

La créatine est un métabolite important pour l'énergie cellulaire puisqu'elle facilite le recyclage de l'adénosine triphosphate (ATP). La méthode de CrCEST permet donc de saturer les protons guanidyls de la créatine à une fréquence de 2 ppm. Plusieurs études cliniques ont d'ailleurs montré l'efficacité du CrCEST pour le suivi de la concentration de ce métabolite dans le muscle du mollet par exemple. Une autre étude a mis en évidence que des concentrations anormales de créatine, évaluées par CrCEST au niveau du myocarde, reflétaient des dysfonctionnements cardiaques chez les patients.²⁰⁵ Récemment, la créatine a été utilisée comme biomarqueur d'une maladie neurodégénérative, l'ataxie de Friedreich. Le CrCEST a démontré sa pertinence pour suivre les patients atteints de cette pathologie au cours du temps.²⁰⁶ En oncologie, des augmentations et des diminutions des concentrations de créatine dans les tumeurs ont été observées, justifiant la nécessité d'une méthode d'imagerie non invasive pour améliorer notre compréhension du rôle de la créatine dans le métabolisme tumoral.^{207,208} Une étude d'IRM CrCEST, sur des modèles précliniques de gliomes, a montré que le contraste CrCEST diminue avec la progression et l'agressivité tumorale.²⁰⁹

- Le glutamate (gluCEST)

Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur majeur du système nerveux central et sa concentration est directement liée à de multiples pathologies neurologiques et psychiatriques.²¹⁰ La concentration de glutamate a été quantifiée grâce au GluCEST avec une saturation sélective des protons amines à une fréquence de 3 ppm. Dans une étude chez des patients atteints de troubles cognitifs, les résultats ont montré une augmentation significative de la concentration de glutamate dans la matière grise de la région préfrontale par rapport aux volontaires sains.²¹¹ Le gluCEST peut également permettre de détecter de manière précoce des patients à risque psychotique. En effet, un niveau plus faible de glutamate a été retrouvé dans certaines régions corticales et sous-corticales gluCEST chez des jeunes patients présentant des symptômes similaires à ceux des patients diagnostiqués schizophrènes par rapport aux patients témoins.²¹² Une autre application en clinique concerne l'épilepsie qui ne peut être diagnostiquée chez un tiers des patients à l'aide de simples IRM anatomiques. Le gluCEST a permis une détection qualitative et quantitative de l'épilepsie temporale non lésionnelle chez les patients.²¹³ Enfin, en oncologie clinique, le gluCEST a montré sa faisabilité chez 10 patients adultes pour la détection de gliomes avec une prise de contraste gluCEST dans l'espace peritumoral.²¹⁴ D'une manière plus générale, le glutamate est une source potentielle d'énergie pour les cellules cancéreuses et, du fait qu'il soit un acide aminé essentiel, le glutamate est impliqué dans la synthèse protéique. Il peut ainsi refléter le processus métabolique des cellules tumorales qui se développent et se multiplient rapidement.²¹⁵ De surcroît, les niveaux de glutamate peuvent considérablement augmenter au cours d'une immunothérapie.²¹⁶ Le gluCEST semble donc être un outil pertinent pour l'imagerie fonctionnelle tumorale.

Pour conclure, il a été montré récemment que les protons amines résonnant à 3 ppm pouvaient aussi représenter un biomarqueur intéressant pour diagnostiquer et suivre les tumeurs présentant une mutation IDH, comme c'est le cas pour de nombreux chondrosarcomes.²¹⁷⁻²¹⁹ Ceci peut s'expliquer par le fait que les protons amines sont sensibles aux variations de pH et que les mutations IDH influencent de nombreux processus biologiques tels que l'oxygénation et le pH des tissus, à travers le facteur HIF.^{117,220}

- Fonctions amides

Les fonctions amides résonnent généralement autour de 3,6 ppm.

- Les amides (APT CEST)

L'imagerie par transfert de protons amides (APT) est une approche d'IRM CEST permettant de détecter les protons amides, des protéines mobiles et des peptides endogènes, qui résonnent à 3,5 ppm.²²¹ Les protons amides sont également sensibles aux variations d'acidité de leur environnement, tout comme les protons amines précédemment décrits, du fait de l'influence du pH sur leur vitesse d'échange avec les protons de l'eau.²²² Initialement, l'APT CEST a été exploité pour étudier les accidents vasculaires cérébraux ischémiques, les troubles neurologiques et les tumeurs cérébrales.²²³⁻²²⁸ Les tumeurs, du fait de leur prolifération anarchique, présentent souvent une accumulation de protéines et de peptides mal formés.^{229,230} Dans une étude préclinique de Yan *et al.*, il a été démontré qu'un contraste APT CEST plus élevé était retrouvé dans les gliomes comparativement au tissu cérébral sain chez le rat. Ces résultats étaient corrélés avec une concentration accrue de protéines cytosoliques dans les tumeurs.²³¹ En clinique, l'APT CEST a été utilisé pour caractériser et diagnostiquer des tumeurs cérébrales chez les patients.²³²⁻²³⁵ Cette méthode a montré son efficacité pour discriminer les lymphomes primitifs du système nerveux central des gliomes de haut grade²³⁶, pour distinguer les métastases cérébrales solitaires du glioblastome²³⁷ et même afin de prédire les mutations génétiques dans les gliomes, en particulier celle de l'IDH.^{238,239} Enfin, l'APT CEST est particulièrement intéressant pour sa capacité à distinguer une pseudo-progression tumorale qui peut s'apparenter à un œdème induit par la thérapie d'une véritable progression tumorale.^{240,241} De la même manière, cet outil est capable de faire la différence entre les parties d'un gliome encore viable et les zones radio-nécrosées de la tumeur permettant ainsi de prédire la réponse thérapeutique tumorale.²⁴²

En plus des tumeurs cérébrales, l'APT CEST a été étudié dans le cancer du sein et de la prostate. Comme cela a été démontré dans les tumeurs cérébrales, cette méthode a été capable de distinguer les tissus sains des tissus cancéreux prostatiques.²⁴³ De surcroît, des variations du signal APT CEST ont été observées dans les tumeurs du sein avant et après thérapie, rapportant probablement un effet thérapeutique avec une modification du tissu mammaire (Figure 38).^{244,245} En résumé, l'APT représente

un biomarqueur prometteur pour l'oncologie permettant de diagnostiquer des tumeurs malignes, de surveiller leur progression mais aussi d'évaluer une potentielle réponse thérapeutique. Cette méthode peut facilement être mise en œuvre avec les imageurs cliniques existants.

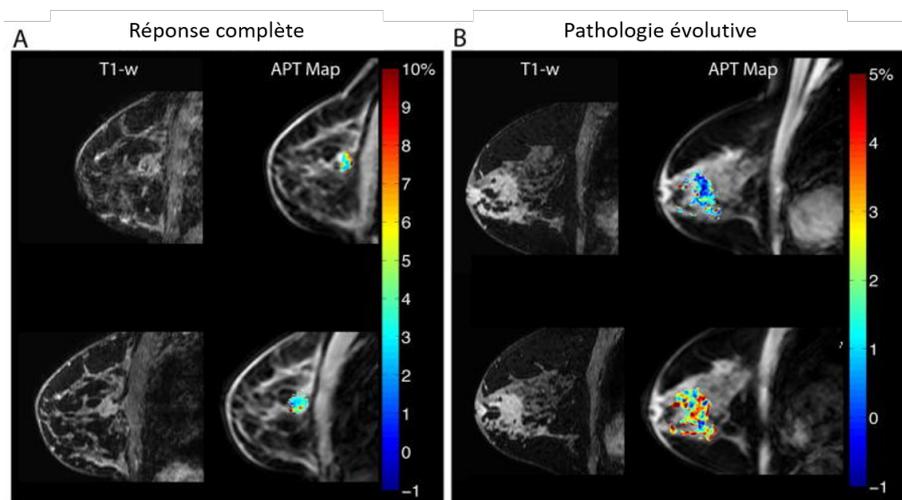


Figure 38: Superposition de cartes APT CEST sur des images anatomiques de cancer du sein permettant d'évaluer la réponse de deux patientes à un cycle de chimiothérapie néoadjuvante.²⁴⁵ Patiente présentant une réponse complète (panel A) et patiente présentant un cancer évolutif (panel B). La ligne du haut correspond à une imagerie pré-traitement et la ligne du bas correspond à une imagerie post-traitement.

- Les agents de contraste iodés (AcidoCEST)

La méthode d'acidoCEST utilise des agents de contraste iodés tels que le iopamidol et le iopromide qui sont des agents diaCEST exogènes mais également utilisés comme agents de contraste pour le scanner. Ils possèdent deux fréquences de résonance dues aux deux pools de protons amides échangeables qu'ils comportent dans leurs structures.^{246,247} Ils engendrent donc deux pics d'effet CEST autour de 4,2 et 5,5 ppm qui permettent d'évaluer le pHe d'un tissu avec précision entre 5,5 à 7,9, indépendamment de la concentration de l'agent de contraste et avec une précision de 0,1 unité pH.²⁴⁸ Actuellement, le iopamidol est l'agent de contraste le plus utilisé de sa catégorie. Au niveau clinique, il a été étudié pour mesurer le pHe de la vessie mais aussi chez une patiente atteinte d'un cancer ovarien métastatique. Une seule métastase sur les trois a absorbé assez d'agent de contraste pour pouvoir évaluer un pHe contrairement à la vessie qui contenait assez d'agent de contraste pour évaluer un pHe fiable. Chez le patient atteint d'un carcinome canalaire invasif de haut grade, une faible absorption de l'agent a été observée dans toute la tumeur et les tissus environnants. Les résultats de ces études cliniques indiquent que les mesures de pHe ne peuvent être effectuées que dans des tissus absorbant fortement l'agent de contraste.^{249,250}

Une molécule peut porter plusieurs fonctions avec des protons échangeables comme à la fois des hydroxyles et des amines et, de la même manière, ces différentes fonctions ont des fréquences de résonance qui se chevauchent parfois. C'est pour cette raison que la méthode IRM CEST est qualifiée de peu spécifique malgré qu'elle soit hautement résolutive, en opposition à l'imagerie nucléaire.

Les différentes imageries fonctionnelles viennent de vous être détaillées dans cette partie, chacune possédant ses avantages et ses inconvénients. Pour cette raison, de nouvelles technologies visent à combiner différentes méthodes d'imagerie, par exemple l'IRM à l'imagerie nucléaire, et sont en cours d'évaluation. Ainsi, l'imagerie fonctionnelle permet d'accéder non plus à la morphologie de la tumeur mais bel et bien au fonctionnement de celle-ci grâce à l'activité des cellules tumorales et de leur microenvironnement.

B) Imageries fonctionnelles de la tumeur et de son microenvironnement

Dans cette partie, nous allons nous focaliser sur l'imagerie fonctionnelle appliquée au métabolisme des cellules cancéreuses et au microenvironnement tumoral du chondrosarcome.

1) Imagerie *in vivo* de la prolifération cellulaire et du métabolisme tumoral

Les tumeurs, en général, présentent une importante et anarchique prolifération cellulaire associée à des propriétés métaboliques sévèrement altérées par rapport aux tissus sains. Une augmentation des métabolismes glucidiques et lipidiques, ainsi que de la synthèse protéique sont observées au sein des cellules tumorales et ces changements peuvent être évalués grâce à l'imagerie fonctionnelle.

L'IRM de diffusion a montré, dans de nombreux cancers, qu'elle pouvait être le reflet de la prolifération cellulaire à travers l'ADC.^{251,252} Concernant le chondrosarcome, la littérature est controversée quant à l'utilisation de l'IRM de diffusion pour aider au diagnostic différentiel ou à la stratification même si la majorité des études confirme le bénéfice apporté par cette technique d'IRM.²⁵³⁻²⁵⁶

Pour l'étude des remaniements cellulaires associés à la prolifération en imagerie nucléaire, la scintigraphie au thallium 201 est un outil de choix car elle cible la pompe Na^+/K^+ ATPase dépendante présente au niveau membranaire des cellules viables. La pertinence de la scintigraphie au thallium 201 a été démontrée dans 4 études cliniques pour le diagnostic et la stratification de 87 chondrosarcomes et 113 tumeurs bénignes cartilagineuses. Cette approche a présenté une sensibilité de 30% et une

spécificité de 91% pour le diagnostic différentiel entre les chondrosarcomes et les tumeurs bénignes cartilagineuses et une valeur prédictive allant de 88 % à 100 % a été observée dans 3 des 4 études.²⁵⁷

La spectroscopie par résonance magnétique (SRM) quant-à-elle permet de visualiser plusieurs métabolites en même temps. Elle peut être basée sur le signal des protons mais aussi d'autres noyaux tels que le carbone 13 ou le phosphore 31.^{258,259} Cette technique non invasive peut être utilisée de manière répétée *in vivo* en préclinique et en clinique. Son principal inconvénient est sa faible sensibilité qui conduit à de long temps d'acquisition afin d'obtenir un spectre fréquentiel résolu. Aussi, la SRM est souvent employée pour des acquisitions monovoxel afin d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit.^{260,261} La SRM permet de visualiser et de quantifier plusieurs métabolites d'intérêts pour l'oncologie tels que le N-acétylaspartate, la choline, la créatine ou encore le lactate. D'autres métabolites pourront également être observés tels que la glutamine ou le glutamate ou encore le D-2HG issu de la mutation des gènes IDH, mutation prépondérante dans les chondrosarcomes. Cependant, la littérature est peu abondante à ce sujet. Une seule étude *in vivo* réalisée à haut champ (9.4T) avec une cryosonde haute performance fait état de la détection du D-2HG dans un modèle murin de chondrosarcome JJ012 grâce à la SRM du proton.²⁶²

Une autre étude en clinique s'est intéressée au signal de la choline attribuée au métabolisme membranaire sur des prélèvements de patients atteints de tumeurs osseuses dont trois présentaient des chondrosarcomes squelettiques. L'étude a mis en évidence une augmentation significative du signal de la choline dans les tumeurs les plus malignes comparativement aux tissus contrôles sains.²⁶³ La SRM peut être aussi utilisée *ex vivo*. En effet, une étude portant sur des échantillons de chondrosarcomes SWARM orthotopiques a mesuré différents rapports de signaux RMN afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique du melphalan et d'un de ces dérivés. Les rats traités présentaient des ratios de signaux marqueurs de l'apoptose cellulaire et caractéristiques de la nécrose significativement plus importants que ceux des rats contrôles non traités.²⁶⁴

Le métabolisme du glucose dans les cellules cancéreuses peut être investigué par IRM grâce au contraste de glucoCEST mais également par TEP au [¹⁸F]FDG. Depuis que le [¹⁸F]FDG a été évalué pour la première fois dans les années 70, il est devenu le radiotraceur de référence pour le bilan d'extension en oncologie.^{265,266} À la suite de son administration par voie intraveineuse, le [¹⁸F]FDG est essentiellement pris en charge par les transporteurs de glucose de type GLUT1 pour pénétrer dans le milieu intracellulaire. Après pénétration intracellulaire, le [¹⁸F]FDG est phosphorylé immédiatement par les hexokinases I à IV pour former le [¹⁸F]FDG-6-phosphate ([¹⁸F]FDG-6-P). À cette étape, la présence du [¹⁸F] en position 2, à la place d'un -OH dans le cas du glucose, empêchera la poursuite du métabolisme glucidique vers la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Ce mécanisme aboutit ainsi à son accumulation dans le milieu intracellulaire et au signal enregistré par imagerie TEP (Figure 39).²⁶⁶

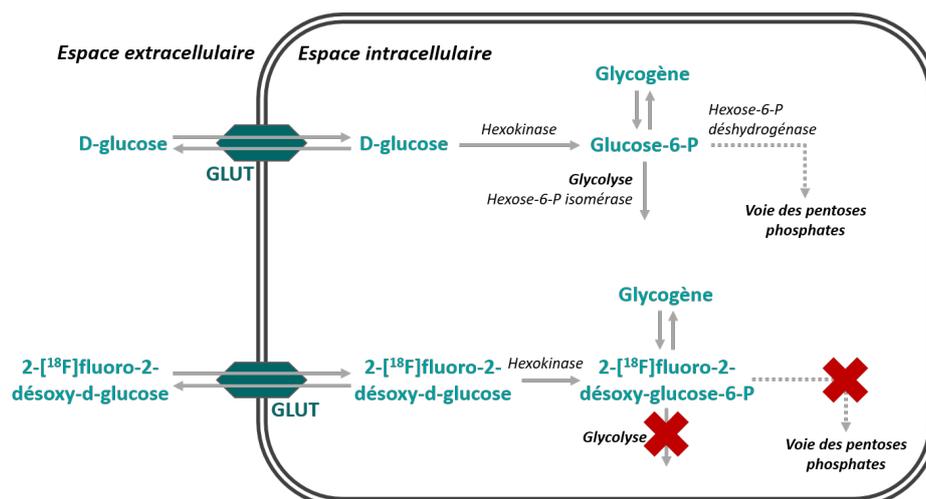


Figure 39: Comparaison des voies métaboliques du D-glucose et du $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ expliquant l'accumulation intracellulaire de ce dernier.

La valeur d'absorption standardisée maximale (SUV_{max}) est corrélée au grade de chondrosarcome alors que les tumeurs bénignes sont plutôt caractérisées par des valeurs de SUV_{max} plus faibles.²⁶⁷ Les résultats publiés dans une méta-analyse récente ont montré que cette méthode d'imagerie présente une spécificité et une sensibilité élevées, pour le diagnostic des chondrosarcomes, supérieures à la scintigraphie au $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{MDP}$ (méthylène diphosphonate), au $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{DMSA}$ (acide dimercaptosuccinique) et au $[^{201}\text{Tl}]$.²⁵⁷ Le $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ est également bénéfique pour la gradation et le suivi des tumeurs.^{267,268} Cependant, la valeur de SUV_{max} seule n'est pas suffisante pour différencier un chondrosarcome de bas grade d'une lésion bénigne.²⁶⁹ Le $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ n'apporte donc qu'une légère plus-value dans le diagnostic du chondrosarcome.

2) Imagerie *in vivo* ciblant les acteurs de l'immunité tumorale

Les nouveaux traceurs pour l'imagerie des acteurs de l'immunité tumorale peuvent être des agents de contraste pour l'IRM ou pour le scanner mais aussi des traceurs radioactifs ou fluorescents. En recherche préclinique, il est également possible de choisir une stratégie d'imagerie bimodale impliquant, par exemple, de l'imagerie optique et de l'imagerie nucléaire.²⁷⁰

La modalité la plus utilisée aujourd'hui pour l'étude de l'immunité en oncologie reste la TEP, nous parlons d'ailleurs d'immunoTEP.²⁷¹ Les principales cibles de l'immunoTEP comprennent les principaux points de contrôle, tels que CTLA-4 (Cytotoxique-T-Lymphocyte- Antigen 4 protein), PD-1 (Programmed cell death protein 1) et PD-L1 mais aussi l'infiltrat immunitaire au sein du microenvironnement tumoral comme les lymphocytes T CD3, les CD8 et les lymphocytes infiltrant les tumeurs, les TILs.²⁷² Les approches les plus utilisées en immunoTEP exploitent un anticorps monoclonal anti-CTLA-4, l'ipilimumab, sous la forme du $[^{64}\text{Cu}]\text{NOTA}$ -ipilimumab, permettant ainsi de suivre

l'expression de CTLA-4 *in vivo*.²⁷³ À notre connaissance, aucune étude ne porte sur l'imagerie de CTLA-4 dans le chondrosarcome.

Une autre cible intéressante pour l'imagerie du système immunitaire est représentée par PD-1 et/ou PD-L1. Un autre essai de phase II est actuellement en cours pour tester l'efficacité de l'atezolizumab (anti-PD-L1) sur des chondrosarcomes de haut grade (NCT04458922) mais cet anticorps peut être marqué avec du Zirconium 89 et fait aussi l'objet d'autres essais cliniques d'immunoTEP sur des tumeurs solides et métastatiques (NCT04006522, NCT02453984, NCT04029181).²⁷⁴

3) Imagerie *in vivo* de l'angiogénèse

L'angiogénèse représente l'un des processus clés de la progression tumorale, c'est pourquoi plusieurs stratégies d'imagerie fonctionnelle ont été mises œuvre afin de visualiser cet événement.

L'angiographie, par exemple, peu être réalisée par IRM pondérée en T_1 ou en T_2^* ^f. Elle nécessite l'injection d'un agent de contraste dans la circulation sanguine, le plus souvent à base de gadolinium. De la même manière que pour le scanner, une IRM de perfusion est réalisée conjointement, de manière dynamique, afin d'apporter des informations complémentaires.²⁷⁵ Une étude clinique regroupant 75 patients atteints de tumeurs bénignes cartilagineuses et 31 patients atteints de chondrosarcomes a mis en évidence la pertinence de l'IRM de perfusion pour réaliser un diagnostic différentiel chez ces patients. En effet, une perfusion plus importante a été retrouvée dans les tumeurs malignes comparativement aux tumeurs bénignes avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 63,3%.²⁷⁶

L'imagerie nucléaire peut également investiguer l'angiogénèse en se concentrant sur deux cibles moléculaires principales : VEGF et le motif RGD des intégrines, constitué d'arginine, de glycine et de sérine. Le premier marquage du motif RGD remonte à 1999 avec le radiotracer $[^{125}\text{I}]$ et est utilisé en scintigraphie sur différents modèles tumoraux chez la souris tels que le mélanome, le carcinome mammaire et l'ostéosarcome.²⁷⁷ Par la suite, de plus en plus de radiotraceurs ont émergé, principalement composés du radionucléide $[^{68}\text{Ga}]$, comme par exemple, le $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-RGD}_2$. Une étude fait cas d'un patient atteint d'un chondrosarcome de grade 2 au niveau du fémur qui présentait une faible fixation au $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ avec un SUV_{max} de 2.1 alors qu'un SUV_{max} de 4.8 a été retrouvé avec le $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-RGD}_2$. Les auteurs considèrent le $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-RGD}_2$ comme une piste prometteuse de stratégie théranostique à employer pour les chondrosarcomes.²⁷⁸

^f T_2^* : paramètre sensible à l'oxygénation du sang, basé sur la source de contraste qu'apporte la désoxyhémoglobine (forme désoxygénée de l'hémoglobine).

4) Imagerie *in vivo* de l'hypoxie et du pH

L'imagerie pondérée en fonction de la susceptibilité (SWI) est une technique d'IRM pondérée en T2*, paramètre sensible à l'oxygénation du sang mais également aux dépôts de calcium et, peut donc être utilisée pour détecter des calcifications tumorales. C'est notamment le cas pour le cancer de la prostate et les tumeurs cérébrales. Elle pourrait être applicable aux chondrosarcomes puisqu'ils présentent eux aussi des calcifications.^{279,280} L'imagerie des taux d'oxygénation du sang (BOLD) est également utilisée dans des études d'hypoxie tumorale lors d'une résistance thérapeutique.²⁸¹ Une dernière méthode d'IRM permet d'explorer l'hypoxie tumorale en faisant inhaler de l'oxygène pur aux patients, puis en mesurant la variation du taux de relaxation longitudinale des protons R1, qui n'est autre que l'inverse du T_1 ($R_1 = 1/T_1$). L'IRM enrichie en oxygène (OE-MRI) a déjà fait ses preuves en préclinique et en clinique notamment dans le cancer du poumon et du rein.^{282,283}

Toujours grâce à l'IRM, il est possible d'évaluer le pH tumoral intracellulaire et extracellulaire directement relié à l'hypoxie comme nous avons pu le comprendre dans la partie « Acidification du microenvironnement tumoral ». Cette fois-ci, l'étude du pH fait appel à des méthodes basées sur l'échange chimique des protons de métabolites d'intérêt avec ceux de l'eau. Le lactate, issu de la glycolyse anaérobie dans les tumeurs en conditions hypoxiques, contribue à une acidification du pH. Comme nous l'avons vu précédemment, le LATEST permet de suivre le lactate par IRM CEST. Un plus grand signal en LATEST s'apparente à une plus grande quantité d'acide lactique, relarguée dans le milieu extracellulaire, associée à une diminution du pH.^{195,284}

Les fonctions amines ont des protons dont la vitesse d'échange varie en fonction du pH. Les amines peuvent résonner à différentes fréquences, il y a notamment les guanidyl à 2 ppm et les autres amines à 3 ppm. Deux études sur le glioblastome ont montré la pertinence de la mesure du signal aminoCEST des amines à 3ppm pour investiguer le pH intracellulaire tumoral.^{220,285}

En ce qui concerne le guanidylCEST, l'étude du pH requière également l'étude du signal des amides à 3,6 ppm par contraste APT CEST. En effet, Jin *et al.* mettent en lumière que les signaux APT CEST et guanidylCEST changent dans des directions opposées avec la diminution du pH *in vitro* et *in vivo* dans un modèle expérimental d'accident vasculaire cérébral sur le rat. Ainsi, la différence entre l'APT CEST et le guanidylCEST peut améliorer la sensibilité de la mesure du pH.²⁰² Une étude de 2022 investigate, *in vitro* et *in vivo*, sur un modèle de cancer colorectal chez la souris, les variations de pHi en utilisant également le signal des guanidyles et des amides. En revanche, ils proposent, plutôt que d'utiliser la différence, de réaliser un ratio des deux signaux afin de se soustraire de l'influence de la concentration de ces protons au sein du tissu tumoral.²⁰³

Au cours de cette thèse, nous avons choisi d'employer cette stratégie en faisant le ratio du signal APT CEST sur le signal guanidylCEST afin d'explorer le pHi tumoral.

La technique AACID (Amine and amide concentration independent detection) est une autre technique permettant de détecter des changements de pHi tumoraux en faisant le ratio du signal APT CEST sur le signal aminoCEST. En revanche, cette méthode a uniquement été utilisée dans le cadre du glioblastome et les protocoles établis nécessitaient l'injection de substance entraînant une acidification tumorale comme la cariporide, l'ionidamine, le topiramate ou encore le dichloroacetate.²⁸⁶⁻²⁸⁹ Une nouvelle étude suggère que l'intégration du signal guanidylCEST en plus des signaux APT CEST et aminoCEST permettrait d'améliorer la détection des variations de pH *in vivo* par la méthode AACID.²⁹⁰ Les amides sont également sensibles aux variations de pH et c'est d'ailleurs pour cela que le signal de l'APT CEST seul peut être utilisé pour explorer le pH intracellulaire. Schüre *et al.* ont notamment observé des variations de signal APT CEST correspondant à des variations de pH *in vivo* mesurées par une technique de référence, la spectroscopie du phosphore 31, chez des patients atteints de glioblastomes.²²² La spectroscopie par résonance magnétique du ³¹P permet d'estimer le pHi à partir du déplacement chimique entre le phosphate inorganique et la phosphocréatine mais cette technique n'apporte aucune résolution spatiale puisque le signal est enregistré dans un seul voxel de taille choisie. La dernière méthode d'IRM CEST qui permet d'évaluer le pH, cette fois-ci, extracellulaire tumoral est l'acidoCEST et fait appel à des agents de contraste précédemment détaillés. L'acidoCEST a montré son efficacité pour évaluer le pH extracellulaire dans le cancer métastatique des ovaires²⁴⁹, dans le myélome multiple²⁹¹, dans le cancer du pancréas^{292,293} et dans le cancer du poumon.²⁹⁴

Après l'IRM, c'est au tour de l'imagerie nucléaire de présenter sa pertinence pour l'étude de l'hypoxie tumorale. Plusieurs radiopharmaceutiques TEP sont étudiés et peuvent être potentiellement utilisés en clinique. Les radiotraceurs les plus utilisés, tel que le [¹⁸F]FMISO (fluoromisonidazole), appartiennent à la famille des nitroimidazoles. Après pénétration cellulaire par diffusion passive, ces radiotraceurs sont réduits par action des nitro-réductases en anions avec un radical nitro (nitroso-FMISO). En présence d'oxygène, les anions sont réoxydés et pourront diffuser dans le milieu extracellulaire. Dans des conditions hypoxiques, la réoxydation n'est pas possible et les dérivés nitroso-FMISO auront la capacité de se lier aux molécules intracellulaires de manière covalente, empêchant ainsi la sortie du traceur. Le [¹⁸F]-Fluoromisonidazole ou [¹⁸F]FMISO a été le premier traceur TEP à cartographier l'oxygénation tissulaire *in vivo* chez l'Homme. Les dernières études évaluant le [¹⁸F]FMISO en oncologie clinique portent, par exemple, sur la surveillance de l'hypoxie chez des patients atteints de cancers ORL au cours d'une chimiothérapie. Les résultats ont montré que les patients qui présentaient un signal [¹⁸F]FMISO localisé spatialement au cours du temps, ont une progression plus lente de leur pathologie, contrairement à ceux qui ont une expansion du signal de [¹⁸F]FMISO au cours du temps.²⁹⁵ Dans le cancer du poumon, le [¹⁸F]FMISO est comparé à un autre radiotraceur de l'hypoxie, le [¹⁸F]FAZA (Fluoroazomycin arabinoside) en préopératoire afin de détecter les lésions cancéreuses les plus hypoxiques. Le [¹⁸F]FMISO détecte plus de lésions que son homologue

chez les patients malgré le fait qu'aucune corrélation entre le SUV_{max} de ces radiotraceurs et les résultats *ex vivo* d'immunomarquages aux GLUT1, CAIX, LDH-5 et HIF-1 α n'ait été mise en évidence.²⁹⁶ Au niveau du cancer du sein, l'hypoxie mesurée par [¹⁸F]FMISO était corrélée négativement avec la microcirculation capillaire des tumeurs mesurée par IRM de perfusion et leur fraction hypoxique augmentait avec la taille de la lésion.²⁹⁷ En revanche, le [¹⁸F]FMISO n'a pas totalement fait ses preuves dans le diagnostic du cancer rectal, du fait de la difficulté d'interprétation des images. En effet, ce radiotraceur s'accumule dans le tube digestif et dans la vessie.²⁹⁸

L'utilisation du [¹⁸F]FMISO en routine clinique est donc sujet à quelques limitations essentiellement dues à son profil pharmacocinétique relativement lent. En effet, sa nature lipophile empêche une élimination rapide du traceur dans les tissus non-cibles. Ceci conduit généralement à un ratio tumeur sur muscle relativement faible (où une valeur de 1,2 est déjà considérée comme spécifique de l'hypoxie) et à l'origine d'images au contraste modéré, rendant difficile la visualisation des régions hypoxiques au niveau du microenvironnement tumoral. De ce fait, des efforts considérables ont été réalisés afin de développer des dérivés, appartenant à la famille de nitroimidazoles, de seconde génération avec des propriétés pharmacocinétiques améliorées. La Figure 40 vous présentent 4 souris porteuses de xénogreffes de cancer du larynx ayant reçu chacune 1 des 4 radiotraceurs TEP de l'hypoxie tels que le [¹⁸F]FMISO, le [¹⁸F]HX4²⁹⁹, le [⁶⁴Cu]ATSM³⁰⁰ et le [¹⁸F]FAZA³⁰¹. Les images démontrent que le [⁶⁴Cu]-diacetylbis(4-methylthiosemicarbazonato) ([⁶⁴Cu]ATSM), faisant partie du groupe des composés non nitroimidazoles, présente un rapport signal sur bruit optimal et à l'heure actuelle, plusieurs études précliniques et cliniques ont évalué et validé son utilisation pour l'imagerie de l'hypoxie dans les tumeurs. C'est le cas pour le cancer du poumon et les tumeurs ORL³⁰², le cancer du col de l'utérus³⁰³ mais aussi le glioblastome.³⁰⁴

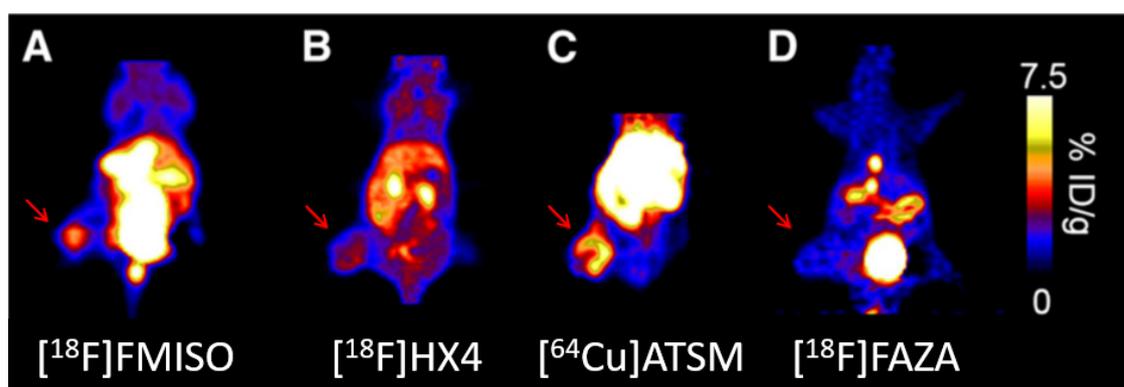


Figure 40: Comparaison des différents traceurs TEP pour l'étude de l'hypoxie tumorale chez la souris.³⁰⁵

Images coronales représentatives obtenues à partir de souris porteuses de xénogreffes cancer du cou, chacune injectée avec le traceur d'hypoxie TEP indiqué. Les images ont été normalisées à la même échelle et la fenêtre sélectionnée pour permettre la comparaison de l'absorption relative de la tumeur. La flèche rouge indique l'emplacement de la tumeur sur le membre postérieur. %ID/g = pourcentage de dose injectée par gramme.

Le facteur de transcription HIF-1 peut être également ciblé en imagerie nucléaire. En effet, une protéine de fusion marquée à l'iode 123, PTD-ODD-SAV (IPOS), a été développée. IPOS possède le même domaine de dégradation oxygène-dépendant que HIF-1 et suit donc la même voie de dégradation. Ainsi, l'IPOS radiomarquée est dégradée dans les cellules oxygénées et s'accumule, tout comme HIF-1 dans les cellules hypoxiques. [¹²³I]-POS a montré *in vivo* une accumulation tumorale élevée et sélective 24 h post-injection avec un ratio tumeur/muscle moyen de 9,6, sur un modèle souris de cancer du sein. De plus, une corrélation positive a été trouvée entre l'accumulation tumorale de [¹²³I]-POS et l'activité de HIF-1 dans les cellules tumorales.³⁰⁶ Une autre sonde, [¹²⁵I]-DKOP30, basée sur le même principe et testée sur le même modèle murin *in vivo*, a montré une accumulation tumorale. De plus, *ex vivo* en autoradiographie au [¹²⁵I]-DKOP30, les régions hypoxiques identifiées coïncident avec celles identifiées par immunomarquage au HIF-1 α et au pimonidazole.³⁰⁷

Une dernière stratégie en imagerie nucléaire pour cibler l'hypoxie vise à radiomarquer des anticorps, fragments d'anticorps ou affibodies dirigés contre CAIX. À ce jour, le radiotracer anti-CAIX le plus efficace dans les essais cliniques est l'anticorps cG250, le Girentuximab. cG250 a été marqué avec de l'Indium 111, de l'iode 124 et le Zirconium 89 pour l'imagerie TEMP et TEP.³⁰⁸ Des études cliniques pilotes chez des patients atteints de carcinomes rénaux métastatiques avec cG250, marqué à l'Indium 111 et l'iode 124, ont démontré une détection réussie des lésions.^{309,310} Afin de diminuer le temps de circulation des anticorps et l'absorption tumorale, des fragments d'anticorps (Fabs) anti-CAIX ont été radiomarqués. Par exemple, l'acide diéthylène triamine penta acétique (DTPA)-cG250(Fab')₂ radiomarqué à l'indium 111 a montré des résultats prometteurs en recherche préclinique. Ce Fab a permis une évaluation quantitative du tissu tumoral positif au CAIX dans un modèle de souris xéno greffées avec des cellules de cancer ORL.³¹¹ Il est également possible de radiomarquer des petites molécules inhibitrices de CAIX, à base de benzène sulfonamide, notamment l'ATS-DTPA-In[In¹¹¹] qui a montré des rapports de signaux tumeur/fond prometteurs dans un modèle murin de cancer colorectal.³¹² De plus, Lau *et al.* ont créé trois inhibiteurs à base de sulfamides avec une puissante inhibition de CAIX. Lors de leur évaluation *in vivo* sur un modèle de souris xéno greffées avec des cellules de cancer colorectal, ces derniers radiomarqués au Gallium 68, ont démontré un ratio tumeur/muscle moyen de 4,63, 1h post-injection.³¹³ D'autres inhibiteurs de CAIX sont en cours d'évaluation, notamment le [¹¹¹In]DO3A-IS1, qui a montré une importante accumulation spécifique dans les tumeurs exprimant fortement CAIX.³¹⁴ Enfin, de petites protéines, les affibodies, peuvent être synthétisées dans le but d'avoir une forte affinité pour des anticorps monoclonaux ciblant CAIX. L'affibody ZCAIX:2 radiomarqué au technétium métastables 99, le [^{99m}Tc]Tc(CO)₃-(HE)₃-ZCAIX:2, s'est révélé le plus prometteur en raison de sa forte fixation tumorale *in vivo* sur des souris porteuses de xéno greffes de cancer rénal.³¹⁵ Une variante de cet affibody marqué à l'Indium 111, l' [¹¹¹In]In-DOTA-

HE₃-ZCAIX:2, a montré l'absorption tumorale la plus importante de tous les composés testés *in vivo* en préclinique sur un modèle murin de cancer rénal métastaté.³¹⁶

L'imagerie nucléaire est également en mesure d'imager les zones tumorales présentant des valeurs de pH plus basses. C'est le principe des pHLIPs, ces peptides changent de forme dans des conditions de pH acide, ce qui leur permet de pénétrer la membrane cellulaire et donc de s'accumuler dans les cellules tumorales en acidose. Plusieurs synthèses de pHLIP telles que WT, Var₃ et Var₇ ont été développées et marquées avec du Cuivre 64 et Fluor 18. Dans l'évaluation préclinique *in vivo* sur un modèle souris orthotopique de cancer du sein, le NO₂A-cysVar₃ s'est avéré être le meilleur candidat avec l'absorption tumorale la plus élevée à 4 h post-injection, qu'il soit marqué avec du Fluor 18 ou du Cuivre 64.³¹⁷ Un peptide modifié de Var₃ marqué au Fluor 18 a été évalué dans un essai clinique de phase I chez des patientes atteintes de cancers du sein mais les résultats ne sont pas encore publiés (NCT04054986).

Le DMSA mime métaboliquement le phosphate et s'accumule dans les cellules cancéreuses les plus acides par hydrolyse. Néanmoins, trois études ont été investiguées au cours d'une méta-analyse dans le but d'étudier l'efficacité du ^{99m}Tc-DMSA dans le diagnostic clinique des chondrosarcomes. Au total, 51 chondrosarcomes et 93 tumeurs bénignes cartilagineuses ont été recensés. Le ^{99m}Tc-DMSA a démontré globalement une sensibilité de 100 % et une spécificité à 47 % dans le diagnostic différentiel du chondrosarcome.²⁵⁷

Il est aussi important de noter que la nécrose est fréquente dans les zones hypoxiques et parce que les cellules nécrotiques ne fixent pas les radiotraceurs de l'hypoxie, elles ont tendance à diminuer le signal en TEP et TEMP. Il est donc essentiel de combiner différentes modalités d'imagerie pour accéder à l'hétérogénéité tumorale et pour une meilleure interprétation des résultats.

5) Imagerie *in vivo* des composants de la matrice extracellulaire

Par IRM tout d'abord, la composition des matrices extracellulaires chondrogéniques peut faire varier, en partie, l'intensité du signal de plusieurs contrastes (Figure 41).

Les contrastes T_2 et T_2^* ressortent en hypersignal lorsque la matrice extracellulaire est riche en collagène puisque ce dernier retient les molécules d'eau. À l'inverse, le contraste $T_{1\rho}$, qui reflète la composition biochimique des tissus, présente en hyposignal une matrice extracellulaire riche en protéoglycanes.³¹⁸⁻³²⁰

L'IRM de diffusion est, elle aussi, sensible à la composition de la matrice extracellulaire. En effet, plus une matrice extracellulaire est dense en fibres de collagène et plus le mouvement des molécules d'eau sera restreint.³²¹

La technique dGEMRIC utilise un agent de contraste à base de gadolinium chargé négativement, le Gd-DTPA²⁻. Après l'injection intraveineuse du produit, ce dernier se distribue au sein de la matrice extracellulaire de manière inversement proportionnelle au contenu en GAGs chargés eux aussi négativement. Autrement dit, plus la matrice extracellulaire est riche en GAGs et moins il y aura d'accumulation de Gd-DTPA²⁻ dans celle-ci. Puisque le Gd-DTPA²⁻ réduit le temps de relaxation T_1 au sein du tissu infiltré, les mesures élevées de T_1 reflèteront une importante teneur en GAGs de la matrice.³²²

L'IRM du sodium permet d'évaluer la concentration de sodium endogène présent dans les tissus grâce à une antenne dédiée. L'ion sodium ²³Na⁺, chargé positivement, est capable de se lier aux charges négatives portées par les groupements sulphate et caboxylate des GAGs. Ainsi, une matrice extracellulaire riche en GAGs présentera un signal en IRM du sodium plus important.³²¹

Enfin, le contraste gagCEST, comme nous l'avons vu précédemment, permet d'imager les groupements hydroxyles portés par les GAGs au sein de la matrice extracellulaire tumorale du cancer du pancréas de stade avancé.²⁰⁰

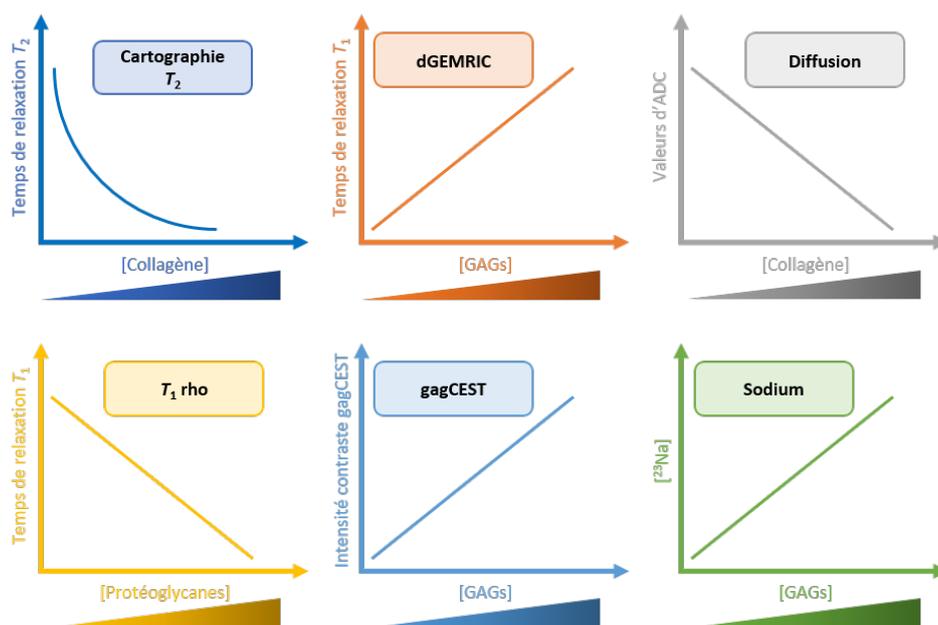


Figure 41: Techniques d'IRM permettant d'évaluer les propriétés de la matrice extracellulaire : représentation de l'intensité du signal IRM en fonction de la concentration en composé.³²¹

Par le manque évident de radiotraceurs dédiés à l'exploration de la matrice extracellulaire, notamment au niveau des protéines fibrillaires, l'UMR 1240 INSERM a développé une stratégie de ciblage des GAGs. En effet, le radiotraceur N-(triéthylammonium)-3-propyl-[15]ane-N5 marqué au ^{99m}Tc et appelé [^{99m}Tc]NTP 15-5 est une molécule bi-fonctionnelle qui possède une fonction ammonium quaternaire (AQ) chargée positivement qui pourra venir se lier aux groupes sulfates et carboxylates des GAGs portant les charges négatives, et un polyazamacrocyclo chélatant le ^{99m}Tc, l'isotope de choix pour l'imagerie TEMP en médecine nucléaire (Figure 42).³²³

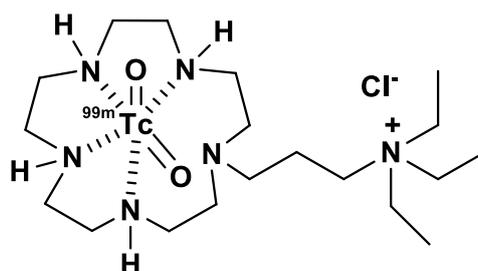


Figure 42: Structure chimique du [^{99m}Tc]NTP 15-5.

Après avoir démontré la liaison spécifique du ^{99m}Tc -NTP 15-5 à l'agrécane et le rôle du vecteur AQ dans ce ciblage, la preuve de concept préclinique de l'intérêt de ce radiotracer pour l'imagerie spécifique du chondrosarcome en médecine nucléaire a été réalisée dans le modèle SWARM sur rats. Deux approches expérimentales ont été évaluées avec un modèle de tumeur primitive implantée en situation paratibiale et un modèle de récurrence locale après implantation en situation condylienne et curettage intralésionnel. Trente minutes après l'administration intraveineuse du radiotracer, une accumulation de celui-ci est observée au niveau du tissu tumoral à raison de 3 à 4% de la dose injectée par gramme. Ce radiotracer est à l'origine d'un excellent contraste en imagerie TEMP *in vivo*, tel qu'illustré par la Figure 43 en TEMP/TDM.

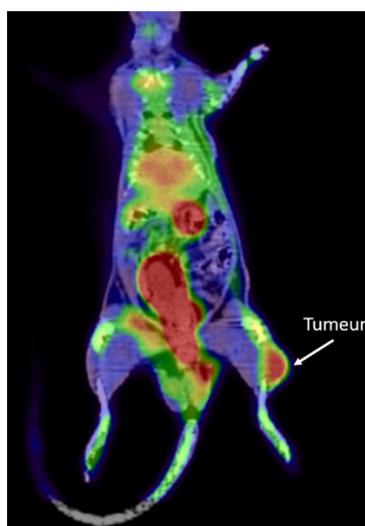


Figure 43: Rat porteur d'un chondrosarcome SWARM implanté en paratibial au niveau de la patte droite et imagé par TEMP/TDM au [^{99m}Tc]NTP 15-5.

Ainsi, le radiotracer [^{99m}Tc]NTP 15-5 autorise un diagnostic dès le stade J+4 post-implantation pour 70% des animaux, quand la scintigraphie osseuse est négative, et le diagnostic au [^{18}F]FDG, traceur de référence en oncologie, n'est positif qu'à un stade tardif J+25, et seulement pour 45% des animaux. Il a démontré sa pertinence pour le diagnostic de la récurrence locale après chirurgie et l'évaluation de la réponse à la thérapie.^{264,324-326} En recherche clinique, le [^{99m}Tc]NTP 15-5 est actuellement évalué dans un essai de première administration chez l'homme (first in human) sur la pathologie de l'arthrose (NCT04481230).

6) Imagerie *in vivo* du remodelage osseux

La scintigraphie osseuse est recommandée pour les plus hauts grades de chondrosarcomes et pour les chondrosarcomes non conventionnels dédifférenciés.³²⁷ Les radiopharmaceutiques utilisés pour une scintigraphie osseuse utilisent des biphosphonates tels l'hydroxyméthylène diphosphonate (HMDP), le MDP ou encore le 2,3-dicarboxypropane-1,1-diphosphonate (DPD) qui ont une grande affinité pour les cristaux d'hydroxyapatite. Une étude clinique a récemment démontré que la scintigraphie osseuse au [^{99m}Tc]HMDP avait permis un diagnostic différentiel chez 34 patients entre un chondrosarcome de bas grade et une tumeur bénigne de type enchondrome avec une sensibilité et une spécificité de 86% et 75%, respectivement.³²⁸ En revanche, une méta-analyse, à la suite de l'étude de 3 articles comprenant 110 chondrosarcomes au total dont 103 était de grade 1, a conclu que la scintigraphie osseuse au [^{99m}Tc]MDP présentait une spécificité de seulement 4 %. Le [^{99m}Tc]MDP semble n'avoir qu'une faible valeur diagnostique, plus faible que celle du [¹⁸F]FDG, dans le cadre des chondrosarcomes conventionnels de grade 1.²⁵⁷

Une exploration du remodelage osseux peut aussi avoir lieu en imagerie TEP par l'intermédiaire du fluorure de sodium marqué au fluor 18, le [¹⁸F]NaF. En effet, une fois injecté, le [¹⁸F]NaF va s'incorporer au réseau osseux en formation, en se substituant aux ions hydroxyles (OH) dans les cristaux d'hydroxyapatite, de façon à produire de la fluoroapatite. Pour l'instant, l'utilisation de la TEP au [¹⁸F]NaF a été évaluée dans l'ostéosarcome en montrant une plus grande performance diagnostique pour la détection des métastases osseuses par rapport à la scintigraphie osseuse.^{329,330}

Nous venons d'explorer les différentes méthodes d'imageries fonctionnelles applicables *in vivo* permettant l'étude des caractéristiques du microenvironnement tumoral du chondrosarcome. Nous allons maintenant nous intéresser aux stratégies thérapeutiques déployées afin de cibler ce dernier.

C) Stratégies thérapeutiques ciblant le microenvironnement tumoral

1) Ciblage des acteurs de l'immunité anti-tumorale

La plupart des immunothérapies sont basées sur l'inhibition des points de contrôles immunitaires par le biais d'anticorps anti-PD-1/2 ou anti-PD-L1/L2. Les chondrosarcomes dédifférenciés sont connus pour avoir une infiltration lymphocytaire tumorale corrélée à l'expression de PD-L1, ce qui suggère que ces tumeurs pourraient être sensibles à l'immunothérapie.¹¹¹ De plus, Yang X *et al.* ont rapporté que PD-L1 et PD-L2 étaient exprimés à hauteur de 68 % et 42 %, respectivement, dans les chondrosarcomes conventionnels et leur expression est associée à celle du marqueur de prolifération cellulaire ki-67 ainsi qu'à un phénotype clinique avancé.³³¹ En revanche, une

seconde étude a mis en évidence l'expression de PD-L1 exclusivement dans les chondrosarcomes dédifférenciés de 42,6 % des patients et non dans les chondrosarcomes conventionnels.¹¹²

Actuellement, quatre essais cliniques sont en cours pour évaluer le bénéfice de l'immunothérapie pour le traitement du chondrosarcome. Trois font appel à des anticorps anti-PD-1 comme le Pembrolizumab (NCT05039801), le Nivolumab (NCT02982486) et le Toripalimab (NCT03474640) et un fait appel à un anticorps anti-PD-L1, Atezolizumab (NCT04458922) mais aucun résultat n'a, pour l'instant, été publié.

Un essai clinique de phase II terminé (NCT02301039) utilisant le Pembrolizumab, a montré que 1 des 5 patients inclus avec un chondrosarcome présentait une réponse partielle au traitement avec une réduction de la masse tumorale supérieure à 50% et durable au-delà de 6 mois. Un autre patient montrait une stabilisation de sa maladie et 3 patients subissaient une progression tumorale. Le critère d'évaluation principal n'a donc pas été atteint pour cet essai clinique.³³² De la même manière, Bilusic *et al.* ont mené un essai clinique de phase I utilisant un anticorps inhibiteur de l'IL-8 chez des patients atteints de tumeurs solides métastatiques ou non résécables (NCT02536469). Dans cet essai, seulement un patient atteint de chondrosarcome a été inclus et une progression de son cancer a été observée sur le mois où ce patient a été suivi.³³³

Enfin, une étude rétrospective sur les résultats cliniques utilisant du Nivolumab incluant seulement deux patients atteints de chondrosarcomes dédifférenciés dont un qui a montré, au stade métastatique, une réponse partielle au traitement. En effet, après avoir reçu 6 cycles de Nivolumab par voie intraveineuse, une réponse partielle a été observée chez ce patient de 74 ans et cette réponse est maintenue après 26 cycles.³³⁴

À notre connaissance, peu d'études précliniques portent sur le ciblage de CTLA-4 dans le chondrosarcome et seulement deux essais cliniques sont actuellement en cours afin d'évaluer cette immunothérapie en association. Le premier est un essai clinique de phase II associant l'anticorps anti-PD1, le Nivolumab et l'anticorps anti-CTLA-4, l'Ipilimumab (NCT02982486). Le second essai de phase I et II est plus récent encore et combine à la fois l'YH001 (anti-CTLA-4) et l'Envafolimab (anti-PD-L1), avec ou sans doxorubicine, chez des patients atteints de chondrosarcomes à un stade métastatique (NCT05448820). Aucun résultat n'est encore publié pour ces deux essais.

2) Ciblage de l'angiogénèse

Dans les lignées cellulaires de chondrosarcome humain, l'angiogénèse est favorisée par l'adiponectine, une hormone métabolique des acides gras.³³⁵ En effet, cette étude montre *in vitro* et *in vivo* sur un modèle de souris portant des xénogreffes de JJ012, que l'adiponectine favorise l'expression de VEGF-A par le biais de son récepteur AdipoR mais aussi par l'intermédiaire de PI3K, de

Akt, de mTOR et des cascades de signalisation du facteur HIF-1 α . Deux autres études ont décrit que les chimiokines CCL5 et CXCR4 favorisent également l'expression de VEGF-A dans les cellules tumorales de chondrosarcome et donc l'angiogénèse en activant la voie PI3K, Akt.^{336,337}

La voie de signalisation PI3K, Akt, mTOR est donc une cible de choix pour l'inhibition de l'angiogénèse dans le chondrosarcome. C'est pour cela qu'une étude a utilisé un inhibiteur de tyrosine kinase, le SU6668, *in vivo* dans un modèle préclinique de chondrosarcome. L'effet anti-angiogénique de SU6668 a été démontré et son utilisation a entraîné une inhibition de la croissance tumorale.³³⁸

Le pazopanib, précédemment décrit dans la partie « Nouvelles chimiothérapies ciblées » est un inhibiteur oral de la tyrosine kinase qui inhibe VEGF. Il a fait ses preuves, dans un essai clinique de phase II, pour les chondrosarcomes conventionnels métastatiques ou non résécables (NCT01330966).⁷¹

Un essai clinique de phase II vient de débuter en associant l'Anlotinib, un inhibiteur de tyrosine kinase qui cible le récepteur de VEGF, à un inhibiteur de PD-1 pour le traitement du chondrosarcome (NCT05193188).³³⁹

3) Ciblage de l'hypoxie

i. Inhibition du facteur de transcription HIF

L'inhibition thérapeutique de HIF peut intervenir à différentes étapes de la voie de signalisation (Figure 44).

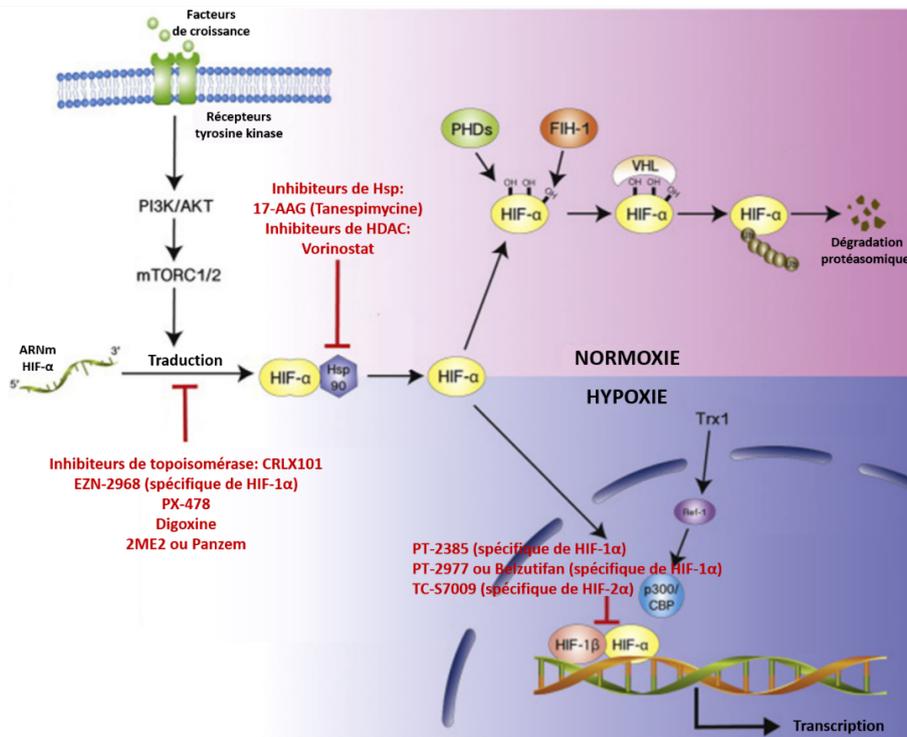


Figure 44: Mécanismes d'actions des inhibiteurs de HIF agissant à différents niveaux de la voie de signalisation HIF.³⁴⁰

Il peut s'agir d'un blocage de la traduction de HIF, c'est le cas de l'inhibiteur de topoisomérase 1, CRLX101 (NCT01652079) qui a déjà fait ses preuves dans le cancer de l'ovaire au cours d'un essai clinique de phase II.³⁴¹ L'EZN-2968 est un oligonucléotide anti-sens de l'ARNm de HIF- α ce qui aura pour conséquence de stopper sa traduction. Une étude pilote a été menée sur des patients atteints de tumeurs solides (NCT01120288) et a démontré que EZN-2968 permettait de moduler, par l'intermédiaire de la régulation de HIF, l'expression de certains gènes cibles impliqués dans la tumorigenèse.³⁴²

Un autre inhibiteur de la traduction de l'ARNm de HIF- α est PX-478. Cette petite molécule dérivée du melphalan est utilisée dans un essai clinique de phase I sur des tumeurs solides et des lymphomes mais aucun résultat n'est pour l'instant publié (NCT00522652).³⁴³

Une nouvelle application a été attribuée à la digoxine, qui semble inhiber la traduction de HIF- α et est actuellement évaluée dans un essai clinique de phase II (NCT01763931) sur le cancer du sein. La 2ME2 (Panzem) inhibe également la synthèse de la protéine de HIF- α et empêche sa translocation nucléaire et donc son activité de facteur de transcription. Malheureusement, dans la plupart des essais cliniques où il est utilisé, le taux de réponse objective globale n'est pas atteint. En revanche, lorsque ce dernier est couplé au bevacizumab, une réduction de la taille des tumeurs de 68% et 11,3 mois de survie sans progression de la maladie sont observés chez les patients atteints de tumeurs carcinoïdes métastatiques (NCT00328497).³⁴⁴

Le 17-AAG ou la tanespimycine inhibe la Hsp90 qui est une protéine chaperonne de HIF- α . Cet inhibiteur entrainera la dégradation prématurée de la protéine HIF- α par le protéasome. De la même manière, le Vorinostat est un inhibiteur d'histones désacétylases qui va maintenir acétylée la Hsp90, qui ne jouera plus son rôle de protéine chaperonne pour HIF- α et provoquera sa dégradation par le protéasome.³⁴⁵ Le Vorinostat a été approuvé pour le traitement des lymphomes cutanés par la Food and Drug Administration suite aux résultats prometteurs d'une étude clinique de phase II.³⁴⁶

Enfin, une inhibition de la dimérisation nucléaire entre les deux sous unités de HIF est la cible des molécules PT-2385 et PT-2977 (Belzutifan). Elles empêcheront ainsi la liaison du facteur de transcription HIF-2 α à l'ADN et donc la transcription de gènes cibles. PT-2385 a montré son efficacité dans un essai de phase I (NCT02293980) avec un contrôle de la maladie chez 66% des patients atteints de carcinomes rénaux métastatiques, cancers présentant fréquemment une expression constitutive de HIF.³⁴⁷ D'autres essais cliniques (NCT03216499, NCT03108066, NCT02293980) sont actuellement en cours pour confirmer l'efficacité de PT-2385. Son homologue de deuxième génération, PT-2977, fait actuellement l'objet de 15 essais cliniques, pour la plupart très récents, et qui concernent principalement le cancer du rein (NCT02974738, NCT03401788).^{348,349} Fait non surprenant puisque le Belzutifan a démontré, *in vivo* dans plusieurs espèces, un profil pharmacocinétique significativement amélioré par rapport à PT-2385.³⁵⁰

Les inhibiteurs de HIF-2 α sont pertinents pour une approche thérapeutique dans le chondrosarcome puisqu'une étude récente a démontré qu'HIF-2 α conférait à ces tumeurs les capacités nécessaires à la croissance tumorale ainsi qu'à l'invasion locale et métastatique. De plus, une inhibition pharmacologique de l'hétéro-dimérisation de HIF-2 α par TC-S7009, associée avec des agents chimiothérapeutiques tels que le cisplatine ou la doxorubicine, améliore de manière synergique l'apoptose des cellules de chondrosarcome SW1353, JJ012 et OUMS-27. De surcroît, cette combinaison thérapeutique a réduit les volumes tumoraux des modèles murins JJ012 sous-cutanés et SW1353 orthotopiques. Dans ce dernier modèle, une inhibition de l'invasion tumorale des tissus mous autour du tibia et une résorption des métastases pulmonaires ont également été rapportées.¹¹⁹

ii. Inhibition de l'anhydrase carbonique IX

DTP348 et DTP338 sont des molécules inhibant spécifiquement CAIX mais seule DTP348 a montré son efficacité *in vivo* dans des modèles précliniques de cancer du sein.³⁵¹ Actuellement, cet inhibiteur de CAIX oral fait l'objet d'un essai clinique de phase I (NCT02216669) incluant des patients atteints de tumeurs solides ou de cancers ORL.

Le SLC-0111 est l'inhibiteur de CAIX le plus étudié en préclinique et en clinique.^{352,353} Actuellement, SLC-0111 est en essai clinique de phase I (NCT02215850) dans le traitement des cancers métastatiques du pancréas. Les premières conclusions sont encourageantes d'après les données de pharmacocinétique et de tolérance chez les patients, le SLC-0111 a été recommandé pour la poursuite en phase II.³⁵⁴

iii. Activation de prodrogues grâce à l'hypoxie

Contrairement aux deux stratégies précédemment décrites, cette dernière consiste en l'exploitation de l'inconvénient qu'est l'hypoxie pour en tirer un avantage. Ainsi, dans les années 90, débute l'investigation des prodrogues activables en hypoxie, ou HAPs. La sélectivité des HAPs repose, en conditions hypoxiques, sur une diffusion facilitée dans les zones pauvres en oxygène du microenvironnement tumoral mais également sur la libération du principe actif cytotoxique dans les cellules tumorales hypoxiques avec la possibilité de diffuser vers les cellules voisines dans les zones plus oxygénées de la tumeur.

Il existe de nombreuses prodrogues activables en hypoxie qui ont été développées ces 3 dernières décennies mais la plus ancienne est probablement la tirapazamine.

La HAP tirapazamine a fait l'objet de nombreux essais cliniques de phases I et II, associée ou non à de la chimio- et/ou de la radiothérapie, dont la plupart ont montré une efficacité et une bonne tolérance chez les patients.^{355,356} En revanche, au cours des essais cliniques de phase III, la molécule

n'a pas réussi à montrer une amélioration significative de la survie globale des patients atteints de cancers ORL, du poumon et du col de l'utérus.³⁵⁷⁻³⁵⁹ L'explication majeure du manque d'efficacité de la molécule en clinique est la faible stratification des patients en fonction de leur fraction hypoxique tumorale.³⁶⁰ Il a aussi été montré que la tirapazamine avait un taux de pénétration relativement faible du fait de son activation précoce dans des conditions d'hypoxie légère. La HAP est métabolisée avant d'avoir eu le temps d'atteindre les régions tumorales les plus hypoxiques.³⁶¹ Fort de ce constat, des prodrogues analogues à la tirapazamine ont été développées avec de meilleures propriétés de pénétration et de métabolisme comme le SN30000.³⁶²

La molécule AQ4N a montré son intérêt en conditions hypoxiques et particulièrement pour l'activation des macrophages hypoxiques associés aux tumeurs. Après la réduction de AQ4N dans les macrophages, il y a la formation de radicaux libres qui entraîneront la destruction des cellules tumorales environnantes.³⁶³ Trois essais cliniques de phase I ont porté sur l'AQ4N en monothérapie ou associé à de la radiothérapie dans des tumeurs solides (NCT00090727), des lymphomes (NCT00109356) et des glioblastomes (NCT00394628).^{364,365} Les principales conclusions de ces 3 essais sont que l'AQ4N est relativement bien toléré par les patients et ceux atteints de tumeurs solides présentent une stabilisation de leur pathologie.³⁶⁵ AQ4N est activé spécifiquement dans les régions hypoxiques et est capable de franchir la barrière hématoencéphalique.³⁶⁴ AQ4N montre un effet anti-tumoral significatif lorsqu'il est associé à de la radiothérapie.³⁶⁶

PR-104, faisant partie de la famille des nitroaromatiques, a été développé au sein de l'université de Auckland.³⁶⁷ Cette HAP subit une réduction mono- ou di-électronique pour former les composés PR-104H et PR-104M qui pourront se lier à l'ADN via des liaisons inter-brins. Huit essais cliniques de phases I et II ont été menés avec et sans l'association de chimiothérapie principalement sur des patients atteints de leucémies, de cancers des poumons, de cancers du foie ou de tumeurs solides mais aucune réponse ou seulement une réponse partielle avec PR-104, associée à une forte toxicité, a été observée.^{368,369} Un essai de phase I et II a néanmoins observé une diminution significative des cellules leucémiques hypoxiques au sein de la moelle osseuse des patients (NCT01037556).³⁷⁰

Parmi les HAPs de seconde génération, le TH-302 ou l'évofosfamide est le plus étudié. Cette molécule a été publiée, pour la première fois, en 2008.³⁷¹ Elle est composée d'un nitroimidazole couplé à un effecteur de type moutarde isophosphoramide bromée (Br-IPM). En conditions hypoxiques, le TH-302 libère, suite à une réaction de réduction mono-électronique, le Br-IPM qui est un puissant agent alkylant de l'ADN (Figure 45).

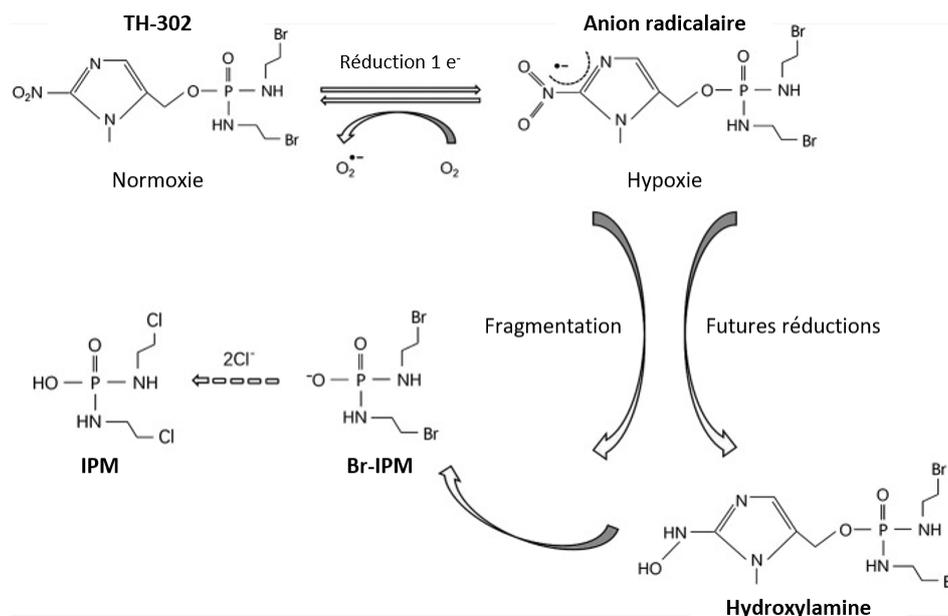


Figure 45: Métabolisme du TH-302.³⁷²

L'efficacité antitumorale du TH-302 en monothérapie a été rapportée dans de nombreuses études précliniques *in vitro* et *in vivo* portant sur différents modèles tumoraux notamment, l'ostéosarcome.^{373,374} *In vitro*, une étude a d'ailleurs montré que le TH-302 avait un important pouvoir cytotoxique sur les cellules d'ostéosarcome cultivées en conditions hypoxiques, alors que les ostéoblastes humains sains n'étaient pas impactés dans les mêmes conditions de culture.^{375,376} *In vivo*, le TH-302 seul a réduit la charge tumorale dans les tibias de souris et associé avec la doxorubicine ou un antagoniste du récepteur pro-apoptotique, tel que la dulanermine ou le drozitumab, il a protégé les os de l'ostéolyse induite par l'ostéosarcome, tout en réduisant également les métastases pulmonaires.^{375,377} Il a été démontré que l'association du TH-302 à d'autres médicaments de chimiothérapie conventionnels, améliore leur effet antitumoral. C'est notamment le cas pour le docétaxel, le cisplatine, le pemetrexed, l'irinotécan, la gemcitabine, le témozolomide et le topotécan.³⁷² Saggari et Tannock ont même démontré que le TH-302 pouvait inhiber la prolifération des cellules tumorales hypoxiques ayant résisté à la chimiothérapie *in vitro* et la réoxygénation tumorale *ex vivo* à partir de xélogreffes de cancers du sein et de la prostate.³⁷⁸

D'autres études précliniques ont étudié la pertinence de l'association TH-302 et radiothérapie et les résultats sont très encourageants. Par exemple, dans le cancer du poumon, le rhabdomyosarcome, le cancer de la peau, le cancer colorectal ou encore le cancer du pancréas, un retard significatif de la croissance tumorale a été observé ainsi qu'une diminution de la fraction hypoxique tumorale.³⁷²

Récemment, deux études précliniques récentes ont associé le TH-302 à de l'immunothérapie anti PD-1 et anti-CTLA-4 dans des modèles expérimentaux de cancer de la prostate et de cancer

ORL.^{379,380} Jayaprakash *et al.* ont démontré que les régions hypoxiques des modèles murins de cancer de la prostate présentaient une plus faible infiltration des lymphocytes T, créant potentiellement des zones de résistance à l'immunothérapie. Ils ont donc combiné le TH-302 avec des anticorps dirigés contre CTLA-4 et PD-1, améliorant considérablement l'effet de l'immunothérapie. Le TH-302 a donc diminué la fraction hypoxique tumorale et favorisé l'infiltrat immunitaire.³⁷⁹ De même, Jamieson *et al.* ont également constaté que la thérapie combinée avec le TH-302 et un anti-CTLA-4 peut encore améliorer les taux de survie d'un modèle syngénique de cancer ORL par rapport à une monothérapie.³⁸⁰

D'un point de vue clinique, le TH-302 est étudié depuis 2007 dans de nombreux essais allant jusqu'à la phase III mais pour l'instant, aucune étude préclinique *in vivo* et clinique n'a étudié la pertinence du TH-302 pour la prise en charge du chondrosarcome. Plusieurs essais cliniques de phases I et II ont rapporté des résultats encourageants pour plusieurs types de tumeurs, tels que les sarcomes des tissus mous, les glioblastomes, le cancer du pancréas et le cancer ORL. Ces cancers sont tous décrits comme particulièrement hypoxiques et résistants aux thérapies, c'est pour cette raison que le TH-302, seul ou en association avec d'autres thérapies, a montré son importante et prometteuse efficacité antitumorale.³⁸⁰⁻³⁸³

Malgré ces résultats cliniques prometteurs, le TH-302 n'a toujours pas reçu l'approbation des autorités de santé. En effet, il a montré une efficacité limitée dans un essai clinique de phase I pour le traitement de la leucémie (NCT01149915) et a échoué dans deux essais cliniques de phase III (NCT01746979, NCT01440088).^{384,385} Les causes possibles pour expliquer ce manque d'efficacité pourraient être le manque de stratification des patients en fonction de leur fraction hypoxique tumorale, l'antagonisme entre les médicaments ou encore les changements de formulation de la prodrogue.³⁸⁶⁻³⁸⁸

4) Ciblage des composants de la matrice extracellulaire

Le ciblage des protéoglycanes de la matrice extracellulaire du chondrosarcome portant de nombreuses charges négatives peut s'effectuer à l'aide de molécules cytotoxiques associées à un AQ chargé positivement. C'est notamment le cas pour le melphalan, un agent alkylant de l'ADN, qui a été couplé à AQ afin d'étudier *in vivo* son action sur un modèle de rat SWARM orthotopique. Le melphalan-AQ a entraîné une réduction significative du volume tumoral chez les rats traités comparativement aux contrôles. De plus, une diminution significative de la fixation tumorale du radiotracer $[^{99m}\text{Tc}]\text{NTP 15-5}$ dans le groupe traité est observée et ces résultats sont confirmés *ex vivo* par dosage biochimique des GAGs et par coloration au bleu alcian.³²⁴

Une autre stratégie thérapeutique pertinente peut être l'inhibition des protéinases de la matrice extracellulaire puisque ces dernières sont à l'origine de la dégradation de la matrice et donc de la prolifération et l'invasion cellulaire mais surtout de la dissémination métastatique.³⁸⁹

De nombreuses études précliniques s'intéressent à l'action des métalloprotéinases (MMPs, ADAMs et ADAMTs) au sein du chondrosarcome.³⁹⁰⁻³⁹² Certaines proposent même de nouveaux inhibiteurs prometteurs tels que le salubrinal qui réduit partiellement l'expression de la MMP-13 ou encore le gefitinib qui diminue l'expression des MMP-2 et 9.^{393,394}

Le zaltoprofène, qui est un anti-inflammatoire, a été aussi décrit comme supprimant l'expression de la MMP-2 dans les lignées cellulaires humaines de chondrosarcome inhibant ainsi la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire.³⁹⁵ Chez un patient atteint d'un chondrosarcome de haut grade au niveau des cervicales de la colonne vertébrale, le zaltoprofène a montré une réduction de l'expression de MMP-2 pouvant expliquer la stabilisation de la tumeur sans métastase durant les 2 ans de traitement. L'administration à long terme de zaltoprofène pourrait prévenir la progression tumorale du chondrosarcome.³⁹⁵

La doxycycline et la doxycycline avec un AQ ont été évaluées *in vitro* sur des cellules de chondrosarcome de rat et *in vivo* dans sur un modèle rat SWARM orthotopique. *In vitro*, les deux composés inhibent l'activité des MMP-13 mais seul le dérivé de la doxycycline avec l'amonium quaternaire inhibe celle de MMP-1. De plus, les deux composés bloquent le cycle cellulaire des cellules tumorales en phase S et G2/M. *In vivo*, ils réduisent de manière significative le volume tumoral mais également la quantité de protéoglycanes présents dans la matrice extracellulaire. Ce dernier résultat est observé *in vivo* par imagerie nucléaire au [^{99m}Tc]NTP-15-5 mais aussi confirmé *ex vivo* par dosage biochimique. De plus, une tendance à la réduction de la quantité relative de MMP-13 est observée dans les tumeurs SWARM traitées.³⁹⁶

D'un point de vue clinique, d'autres inhibiteurs des MMPs comme le marimastat et le prinomastat ont été testés dans le cancer du poumon (NCT00002911, NCT00003011) et n'ont pas montré de résultats anticancéreux significatifs.³⁹⁷ Mais actuellement, aucun essai clinique ne porte sur l'inhibition des métalloprotéinases dans le chondrosarcome.

Du côté des inhibiteurs d'ADAMS, la molécule INCB7839 cible sélectivement les ADAMs 10 et 17 et est utilisée dans 5 essais cliniques actuellement. Ils concernent les cancers du sein (NCT01254136, NCT00864175), les tumeurs cérébrales (NCT04295759), les tumeurs solides (NCT00820560) et les lymphomes non hodgkiniens (NCT02141451) mais aucun résultat clinique n'est, pour l'instant, publié.

5) Ciblage du remodelage osseux

Le chondrosarcome est une tumeur qui interagit particulièrement avec son environnement osseux comme nous avons pu le voir dans la partie « Interactions entre le chondrosarcome et l'os ». Par exemple, une dérégulation du couplage ostéoblastes-ostéoclastes a lieu au sein des sarcomes osseux et cela induit la libération de facteurs initialement piégés dans la matrice osseuse, qui à leur tour, favorisent la prolifération des cellules tumorales.¹⁵⁵ La stimulation des ostéoclastes s'effectue par l'intermédiaire de l'hormone parathyroïde PTHrP sécrétée par les chondrocytes tumoraux qui va réguler positivement l'expression de RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand). Ainsi, pour éviter la dégradation de l'os et donc, lutter contre la progression tumorale, une inhibition des ostéoclastes peut être envisagée comme stratégie thérapeutique.³⁹⁸ Deux types de molécules permettent d'inhiber la formation et le maintien des ostéoclastes, les bisphosphonates et les molécules inhibant RANKL.

Les bisphosphonates sont des molécules ayant une grande affinité pour l'os en se liant fortement à l'hydroxyapatite. Les bisphosphonates pourront ainsi être ingérés par les ostéoclastes et induire leur apoptose. L'acide zolédronique est un bisphosphonate qui a fait ses preuves en tant qu'anti-cancéreux dans plusieurs études précliniques et une étude clinique sur le chondrosarcome.^{325,398-401} De plus, un essai clinique de phase I a débuté en Juillet 2017 afin d'étudier l'effet d'une chimiothérapie néoadjuvante à l'acide zolédronique sur des chondrosarcomes résécables de tout grade (NCT03173976). Malheureusement, à ce jour, aucun résultat n'a encore été publié.

L'anticorps anti-RANKL le plus étudié actuellement reste le denosumab. Un essai clinique de phase II impliquant le denosumab comme traitement de l'ostéosarcome est actuellement en cours (NCT02470091) mais, pour l'instant, aucun essai clinique ne porte sur la pathologie du chondrosarcome.

IV) Objectifs du travail de thèse

L'état de l'art a démontré que le chondrosarcome est encore considéré comme une tumeur chimio- et radio-résistante du fait de son microenvironnement. Il est donc primordial de pouvoir caractériser ce microenvironnement tumoral à l'aide d'une stratégie d'imagerie multimodale fonctionnelle qui permettrait une meilleure stratification des patients et donc une amélioration de leur prise en charge grâce à une médecine personnalisée.

C'est dans ce contexte que se sont inscrits mes travaux de thèse regroupés au sein de deux objectifs :

Le premier a été de **développer la méthode d'IRM CEST pour caractériser certaines propriétés du microenvironnement tumoral du chondrosarcome** : la teneur en protéoglycanes de la matrice extracellulaire et la fraction hypoxique.

Le second objectif a été d'**évaluer l'intérêt de la stratégie d'imagerie bimodale IRM CEST et imagerie nucléaire pour le suivi fonctionnel *in vivo* des remaniements du chondrosarcome**, associés à la croissance tumorale et à la réponse thérapeutique avec une approche ciblant le microenvironnement.

Chapitre 3 : Travail expérimental

I) Présentation de l'article « Simultaneous proteoglycans and hypoxia mapping of chondrosarcoma environment by frequency selective CEST MRI »

Ce premier chapitre décrit les recherches effectuées pour atteindre le premier objectif de ma thèse : la caractérisation du microenvironnement tumoral du chondrosarcome de manière non invasive par l'IRM CEST.

Dans un premier temps, de nombreuses optimisations ont été réalisées *in vitro* sur des solutions témoins mimant différentes concentrations en protéoglycanes ou différentes valeurs de pH retrouvées *in vivo*. Cette étape a permis d'optimiser les paramètres d'acquisition et également le traitement des données.

Dans un second temps, la caractérisation, en terme de protéoglycanes et de pH, du microenvironnement tumoral du chondrosarcome SWARM implanté chez la souris a été réalisée par IRM CEST *in vivo* et comparée avec les méthodes d'imageries fonctionnelles telles que la TEMP au [^{99m}Tc]NTP 15-5 et la TEP au [¹⁸F]FMISO. Ces travaux ont donné lieu à une première publication dans Magnetic Resonance in Medicine en 2021.

A) Contexte et objectifs de l'étude

De nombreuses composantes constituent le microenvironnement tumoral rendant sa caractérisation complexe par imagerie *in vivo*. De précédents travaux en imagerie nucléaire ont toutefois permis d'étudier certains aspects du microenvironnement dans différents modèles expérimentaux de chondrosarcome en s'intéressant d'une part, à sa teneur en protéoglycanes dans la matrice extracellulaire et d'autre part, à sa fraction hypoxique. Depuis quelques années, la littérature rapporte l'intérêt de l'IRM CEST pour la visualisation des protons échangeables appartenant aux fonctions hydroxyles portées par les GAGs (gagCEST) ainsi que les fonctions guanidyles et amides (guanidylCEST et APT CEST) dont la vitesse d'échange est sensible au pH. Ces différents signaux pouvant être identifiés sur un même spectre Z acquis par IRM CEST, cette méthode d'imagerie pourrait permettre la visualisation des deux composantes principales du chondrosarcome en un seul examen.

Ainsi, nous avons souhaité développer l'IRM CEST dans le but d'évaluer sa pertinence pour la visualisation des deux composantes majeures du microenvironnement du chondrosarcome qui sont sa teneur en protéoglycanes et son caractère hypoxique et ceci en un seul examen non invasif et résolutif.

B) Méthodes

Une preuve de concept *in vitro* a été réalisée sur deux solutions : une solution de concentrations croissantes en GAGs réalisée avec de la chondroïtine-4-sulphate et une solution de protamine, portant des fonctions guanidyles et amides, à différents pH.

Par la suite, nous avons choisi de poursuivre notre étude *in vivo* sur un chondrosarcome SWARM implanté en sous cutané chez la souris immunodéprimée au niveau des omoplates. Ce modèle a été choisi car il avait précédemment montré un microenvironnement tumoral possédant une matrice extracellulaire riche en protéoglycanes et un niveau d'hypoxie modéré. Entre 12 à 16 jours post-implantation, lorsque la tumeur est mesurable, le microenvironnement tumoral a été exploré par une approche préclinique d'imagerie multimodale permettant de comparer le signal obtenu par IRM CEST aux données obtenues par imagerie nucléaire. Pour la composante matrice extracellulaire, les résultats d'IRM CEST ont été confrontés à ceux d'imagerie TEMP exploitant le radiotracer $[^{99m}\text{Tc}]$ NTP 15-5 développé par IMoST pour le ciblage des charges négatives portées par les protéoglycanes. Concernant la composante hypoxie, ces mêmes résultats d'IRM CEST ont été comparés à l'imagerie TEP au $[^{18}\text{F}]$ FMISO, radiotracer ciblant l'hypoxie.

Les données d'imageries *in vivo* ont été complétées par des analyses *ex vivo* sur les tumeurs prélevées à l'issue des examens d'imagerie. La teneur en protéoglycanes a été déterminée par dosage biochimique et évaluée grâce à de l'histologie au bleu alcian. La fraction hypoxique a été déterminée par de l'immunofluorescence au pimonidazole.

C) Principaux résultats

Les deux solutions de chondroïtine-4-sulfate et de protamine ont permis de montrer que l'IRM CEST était capable de détecter différentes concentrations de GAGs mais également différentes valeurs de pH *in vitro* dans nos conditions.

In vivo, l'analyse quantitative de gagCEST a mis en évidence un contraste significativement plus intense dans le microenvironnement tumoral que dans le tissu sain à proximité. Cette différence significative est également retrouvée en imagerie nucléaire TEMP au $[^{99m}\text{Tc}]$ NTP15-5 mais aussi *ex vivo* avec le dosage biochimique des GAGs et la coloration au bleu alcian montrant la richesse en GAGs de la matrice extracellulaire de ce modèle. Concernant l'imagerie du pH *in vivo*, le rapport du contraste des amides sur le contraste guanidyles (ratio APT / GuanidylCEST) a été étudié. Ce dernier a permis de mettre en évidence une importante hétérogénéité au sein du microenvironnement tumoral. Le statut modérément hypoxique du microenvironnement tumoral de ce modèle SWARM chez la souris a été confirmé par l'imagerie TEP $[^{18}\text{F}]$ FMISO et *ex vivo* par l'immunofluorescence au pimonidazole.

D) Principales conclusions

Nous avons développé cette méthode innovante d'imagerie qu'est l'IRM CEST *in vitro* mais aussi *in vivo*. L'IRM CEST nous a permis de cartographier simultanément deux composantes fondamentales du microenvironnement tumoral du chondrosarcome au cours d'une seule acquisition et sans injection de produit de contraste en exploitant la sélectivité fréquentielle de l'effet CEST. Un potentiel avantage de l'IRM CEST par rapport aux approches d'imagerie nucléaire est la résolution de l'image. Ainsi, même si ce modèle est modérément hypoxique, l'IRM a permis de mettre en évidence l'hétérogénéité tumorale. Ce gain d'informations pourrait être d'intérêt notamment pour la stratification des patients en oncologie

Simultaneous proteoglycans and hypoxia mapping of chondrosarcoma environment by frequency selective CEST MRI

Roxane Autissier^{1,2,3}  | Leslie Mazuel^{1,2,3}  | Elise Maubert²  |
 Jean-Marie Bonny^{1,3}  | Philippe Auzeloux²  | Sébastien Schmitt²  |
 Amidou Traoré^{1,3}  | Caroline Peyrode²  | Elisabeth Miot-Noirault²  |
 Guilhem Pagés^{1,3} 

¹INRAE, UR QuaPA, Saint-Genès-Champagnelle, France

²Université Clermont Auvergne, INSERM, U1240 Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, Clermont-Ferrand, France

³INRAE, ISC AgroResonance, Saint-Genès-Champagnelle, France

Correspondence

Roxane Autissier, UMR1240 IMoST
 INSERM, Université Clermont Auvergne,
 58, rue Montalembert, 63005 Clermont
 Ferrand, France.
 Email: Roxane.Autissier@uca.fr

Funding information

Supported by Ligue Contre le Cancer
 Auvergne - Rhône - Alpes, project
 R16146C

Purpose: To evaluate the relevance of CEST frequency selectivity in simultaneous *in vivo* imaging of both of chondrosarcoma's phenotypic features, that are, its high proteoglycan concentration and its hypoxic core.

Methods: Swarm rat chondrosarcomas were implanted subcutaneously in NMRI nude mice. When tumors were measurable (12-16 days postoperative), mice were submitted to GAG, guanidyl, and APT CEST imaging. Proteoglycans and hypoxia were assessed in parallel by nuclear imaging exploiting ^{99m}Tc-NTP 15-5 and ¹⁸F-FMISO, respectively. Data were completed by *ex vivo* analysis of proteoglycans (histology and biochemical assay) and hypoxia (immunofluorescence).

Results: Quantitative analysis of GAG CEST evidenced a significantly higher signal for tumor tissues than for muscles. These results were in agreement with nuclear imaging and *ex vivo* data. For imaging tumoral pH *in vivo*, the CEST ratio of APT/guanidyl was studied. This highlighted an important heterogeneity inside the tumor. The hypoxic status was confirmed by ¹⁸F-FMISO PET imaging and *ex vivo* immunofluorescence.

Conclusion: CEST MRI simultaneously imaged both chondrosarcoma properties during a single experimental run and without the injection of any contrast agent. Both MR and nuclear imaging as well as *ex vivo* data were in agreement and showed that this chondrosarcoma animal model was rich in proteoglycans. However, even if tumors were lightly hypoxic at the stage studied, acidic areas were highlighted and mapped inside the tumor.

KEY WORDS

CEST, chondrosarcoma, hypoxia, MRI, nuclear imaging, proteoglycans

2 | Magnetic Resonance in Medicine

1 | INTRODUCTION

Chondrosarcoma (CHS) is a malignant cartilaginous tumor representing the most common primary bone cancer in adults.^{1,2} CHS is characterized by a dense heterogeneous extracellular matrix, a low percentage of dividing cells, and poor vascularity.³ The combination of these 3 factors leads to chemotherapy and radiation therapy resistance.⁴⁻⁸

Dense and fibrotic extracellular matrix with high levels of collagen and proteoglycans (PGs) is recognized to impair interstitial transport of drug from blood to cancer cells.⁹ In addition, the acidic microenvironment associated with hypoxia may electrostatically charge the drugs, limiting their ability to cross biological membranes.¹⁰ In vivo assessment of the phenotypic topological heterogeneity of the tumor microenvironment is key to optimizing personalized therapies. Although biopsy is subject to sampling and pathologist/observer variability, microenvironmental characterization is mainly achieved from biopsy samples to determine grade and staging of the disease.¹¹ Tumor evaluation requires access to morphological and protein information in a context that takes into account intratumoral heterogeneity as a whole. In such a situation, developing imaging methods to access the main recognized CHS features, that is, chondrogenic matrix and hypoxia, would be of great interest for diagnosis and clinical follow-up. Indeed, the current clinical imaging methods recommended, that is, CT and MRI,¹² are used to define tumor morphology and distinguish postoperative residues from postoperative or post-chemotherapeutic residual lesions. However, such approaches cannot be used in the same manner as functional imaging to assess tumor environment.¹³

Functional imaging can be done with specific radiotracers to access metabolic data useful to diagnose and assess the therapeutic response of CHS. Due to their rarity, there is a lack of large trials on functional imaging of chondroid tumors. Nowadays, nuclear medicine used to image CHS in a clinical context targets either the bone remodeling or the glucose tumoral metabolism with radiotracers such as ^{99m}Tc-MDP or ¹⁸F-FDG, respectively.¹⁴ To more accurately image the CHS microenvironment, radiotracers should target either extracellular matrix PGs or the CHS hypoxia feature. ^{99m}Tc-NTP 15-5 emerged from our lab as a candidate single photon emission computed tomography (SPECT) tracer for the functional imaging of cartilage by targeting PG negative charges in extracellular matrix. It demonstrated its relevance to specifically diagnose on CHS animal model and is expected to enter clinical trials shortly.¹⁵⁻¹⁷ One of the radiotracers extensively used in clinic for hypoxia is ¹⁸F-FMISO.¹⁸ As with many nitroimidazole derivatives, under reduced oxygen conditions this tracer is reduced into a R-NO₂ radical that binds covalently to intracellular molecules, ultimately leading to the entrapment of

the tracer in hypoxic cells. To image both tumor features, 2 nuclear exams are required with 2 injections of radioactive agent. Therefore, it would be interesting to develop a method to simultaneously image both metabolic properties of CHS.

The recent rise of CEST MRI has opened up new perspectives in the imaging of biological molecules within the tumoral microenvironment.¹⁹ This method is based on the exchange between saturated labile protons of the solute with the bulk water, revealing the endogenous contrast of some chemical functions. CEST MRI indirectly maps these low concentration metabolites by monitoring the variation of an elevated water signal. Typically, a CEST experiment is a 2-step process. First, the magnetic field inhomogeneity must be mapped; this is the function of the so-called water saturation shift referencing acquisition. Second, MR images must be recorded at several saturation frequency offsets to record a z-spectrum (normalized water signal as a function of the saturation offset for each voxel). This z-spectrum, with a zero-frequency referenced to the water's frequency, will display an extra water attenuation at the metabolite exchangeable proton frequency, that is, the CEST effect. To quantify this CEST effect, the first proposed method was based on the analysis of the water signal intensity at the offset of interest and its counterpart negative value. This magnetization transfer ratio asymmetry analysis hypothesizes the absence of the magnetization transfer effect for negative offsets. Because this hypothesis is not systematically verified, other z-spectrum analyses were developed, that is, a 3-offset measurement approach or multiple-pool Lorentzian-fitting method.^{20,21} Hydroxyl, guanidyl, and amide moieties were independently imaged by CEST MRI.^{22,23} Readers interested in a deeper explanation of CEST MRI principles are referred to the following references.²⁴⁻²⁶

CEST MRI has demonstrated its relevance for the quantitative evaluation and mapping of PGs in cartilaginous tissues by assessing the chemical exchange of saturable protons with the hydroxyl groups (i.e., around 0.5-1.5 ppm) of glycosaminoglycan (GAG) molecules^{27,28} in both physiological and pathological situations.²⁹⁻³¹ In addition, CEST MRI has been demonstrated to be sensitive to pH variations, indirectly revealing information on the metabolic switch in response to hypoxia.³² Several studies have demonstrated that pH variations impact the chemical exchange rate of both guanidyl and amide moieties.^{33,34} The change in the chemical exchange rate with the pH leads to a variation of the CEST intensity at frequencies of around 1.8 to 2.4 ppm and 3.0 to 4.0 ppm for guanidyl and amide proton transfer (APT) CEST, respectively. Therefore, the combination of both guanidyl and APT CEST has been proposed as a highly sensitive method to explore extracellular pH acidification in tumors.^{35,36}

Considering that PGs and pH each have their own resonance frequencies and are therefore sensitive to different exchangeable moieties, we decided these 2 features would merit further study using a single CEST MRI acquisition on CHS animal model. The aim of this study was to evaluate the relevance of frequency-selected CEST MRI to simultaneously map PG concentration and pH of CHS tissue *in vivo*. To validate this approach, CEST MRI was compared to the standard reference nuclear imaging as well as *ex vivo* analysis.

2 | METHODS

2.1 | GAG and pH phantom experiments

Phosphate-buffered saline 1X (Gibco Laboratories, Gaithersburg, MD) containing 1% of bovine serum albumin solution (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) was used to prepare the chondroitin 4-sulfate phantom. Five samples of the chondroitin 4-sulfate (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) were prepared at 1, 5, 10, 20, and 40 mg/mL at pH 7.4. For protamine phantom, 15 mg/mL of protamine (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) and 0.15 mM of $MnCl_2$ were dissolved in phosphate-buffered saline. Four samples of protamine were prepared with pH ranging from 6.5 to 7.7 in 0.4-unit increments. Both phantoms (chondroitin 4-sulfate and protamine) were prepared with 15% gelatin in water to fix the syringes containing the different solutions. Phantoms were submitted to the same acquisition and analysis protocols as described below, except for B_1 , which was set to 3 μT .

2.2 | Xenograft model of Swarm rat CHS

Experiments were conducted in accordance with the European directive 2010/63/EU after approval by the animal ethical committee C2E2A (authorization number #15991).

Swarm rat CHS xenografts were performed in 5-week-old female NMRI nude immunodeficient mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) from frozen fragments after reactivation in 4-week-old male Sprague Dawley rats (Charles River Laboratories France, Saint Germain Nuelles, France). For reactivation, Swarm rat CHS fragments were defrosted in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco Laboratories, Gaithersburg, MD) and then implanted subcutaneously on the right flank of 3 anesthetized rats (isoflurane; 2.5%, 1 L/min, air/O₂, 70/30, v/v). After 22 days postsurgery, tumors were resected and immediately placed in cold Dulbecco's Modified Eagle Medium. Next, they were manually calibrated to 1 mm³ and transplanted subcutaneously between the shoulder blades on anesthetized (isoflurane; 1.5%, 1 L/min,

air/O₂, 70/30, v/v) NMRI Nude immunodeficient mice (n = 10), and cutaneous wounds were sutured.

2.3 | In vivo animal imaging

All imaging experiments were performed at IVIA facility (Clermont-Ferrand, France; <https://doi.org/10.18145/ivia>). Imaging protocols were performed on the same mice 12 to 16 days after induction, corresponding to an average tumoral volume of 215.04 ± 86.28 mm³ (see Supporting Information Figure S1). During these *in vivo* acquisitions, all animals were anesthetized by isoflurane (1.5%, 1 L/min, air/O₂, 70/30, v/v). All animals were secured on a dedicated bed with both breathing rate and temperature being monitored during acquisitions. Supporting Information Table S1 describes in detail the animal distribution for each imaging modality.

2.3.1 | MR imaging

MR images of mice (n = 10) were acquired on an 11.7 Tesla Bruker BioSpec system (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) piloted by Paravision 6.0.1 software (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany). A 72-mm circular polarizer volume coil was used for RF transmission, and a surface array coil (2 × 2) positioned on both the tumor and the adjacent muscle received the NMR signal (Bruker BioSpin).

DW imaging

Tumor imaging was performed with a DWI sequence (b = 500 s.mm⁻², direction [0,0,1]) with a TE of 27 ms and a TR of 2000 ms. The FOV was 40 mm with an axial slice thickness of 1 mm leading to a nominal resolution of $0.26 \times 0.26 \times 1$ mm³. The number of slices was adjusted to image the whole tumor (generally, 12 slices were needed). Two averages were performed for a total acquisition time of 7 min 32 s.

CEST imaging

CEST acquisitions were based on a rapid acquisition with relaxation enhancement sequence with an effective TE and TR of 4.756 and 4500 ms, respectively, and an acceleration factor of 16. The slice thickness was 2 mm and the FOV 40 mm, that is, the in-plane voxel size was 0.625×0.625 mm². Each image was recorded from a single transient. A z-spectrum was recorded to correct for B_0 inhomogeneities using the water saturation shift referencing approach³⁷ (saturation pulses B_1 0.1 μT , 54.8 ms gaussian pulses repeated 18 times with an interpulse delay of a 0.010 ms, and a bandwidth of 20 Hz leading to a train of 1 s; saturation offsets from ± 1000 Hz with $\Delta\omega$ 20 Hz), followed by the CEST z-spectrum (30 min acquisition duration with saturation pulses: B_1 1.5 μT , 54.8 ms gaussian pulses repeated 72 times with a bandwidth of 50 Hz leading to a train

of 4 s and an equivalent continuous wave CEST saturation of 0.6 μT ; saturation offsets from ± 2500 Hz with $\Delta\omega$ 50 Hz). CEST MRI data were analyzed with an in-house program written in MatLab R2017a (MathWorks, Natick, MA). In brief, a ROI was manually drawn on the high-resolution DW image to delineate the tumor and muscle of the scapular region. Then, B_0 shift was corrected pixel by pixel with the water saturation shift referencing approach. Finally, the CEST methodology applied to analyze the data depended on the saturation offset. For GAG CEST, the analysis was performed on the whole image, and the z-spectrum was fitted with 2 Lorentzian shapes: the first one to estimate the signal attenuation due to the water direct saturation (centered at 0 ppm), and the second one for the hydroxyl moieties. The GAG CEST signal intensity corresponded to the area of this latter Lorentzian shape. Regarding guanidyl and APT CEST, we applied the 3-offset measurement approach proposed by Jin et al.²⁰ to avoid nuclear Overhauser enhancement interferences. In practice, 2 limits were chosen (1.60-2.40 and 3.20-4.00 ppm for the guanidyl and amide moieties, respectively), and a baseline was drawn between these frequencies. The CEST effect for APT* and guanidyl* were quantified as the difference between the baseline and the water signal at 1.96 and 3.68 ppm, respectively. The ratio of APT*/guanidyl* was then calculated. The relative variation of this ratio was expressed from the mean ratio value on the ROI.

2.3.2 | Nuclear imaging

PGs imaging by SPECT/CT using ^{99m}Tc-NTP 15-5 radiotracer

SPECT-CT images were acquired using a camera (NanoScan, Mediso Ltd, Budapest, Hungary) equipped with 4 multi-pinhole detectors APT62. Acquisitions were performed on Nucline software (v3.00.018, Mediso Ltd, Budapest, Hungary). 20 MBq of ^{99m}Tc-NTP 15-5, radiolabeled as described,³⁸ were injected intravenously in the tail vein. After 30 min, mice (n = 10) were anesthetized and imaged. Anatomic CT acquisition consisted of a helical scan with 480 projections, 300 ms per projection, 50 kV, 590 μA . Then, SPECT images were performed with 128 projections, 20 s per projection, and an energy window set at 140 keV \pm 20%. After image reconstructions using the 3D ordered subset expectation maximization algorithm, analyses were performed with InterView FUSION (v3.03.074, Mediso Ltd, Budapest, Hungary) software using an interpolated ellipse region of interest for both tumor and scapular muscle manually drawn slice by slice. Activity concentrations were obtained in kBq/mL.

Hypoxia PET imaging using ¹⁸F-FMISO

PET images were acquired using a small animal device (eXplore Vista 4.10 build 465, GE Healthcare, Chicago, IL). 30 MBq of ¹⁸F-FMISO were injected intravenously in the

tail vein. Four hours later, the mice (n = 10) were anesthetized, and PET imaging was performed with a 250 to 700 keV energy window and 6 ns coincidence time window (30 min duration, 2 bed positions) with eXplore Vista PET-CT MMWKS software (GE Healthcare). After 2D ordered subset expectation maximization reconstructions, analyses were performed with VivoQuant (v4.0 patch1, inviCRO, Boston, MA) software using a 3D region of interest for tumor, and scapular muscle manually drawn. ¹⁸F-FMISO uptake was quantified in kBq/mL.

2.4 | Ex vivo analysis

Histological and immunofluorescence analysis in tumoral tissues were performed at the histopathology facility Anipath (CNRS UMR 6293/Inserm U1103 GReD, Clermont-Ferrand, France).

After a multimodal imaging session, 20 days postinduction, mice (n = 3) were sacrificed by cervical dislocation under anesthesia, and tumors were resected and cut into 2 samples. The first sample was fixed into 10% neutral buffered formalin for 24 h and embedded in paraffin for histological analysis (Alcian blue or pimonidazole staining). The second sample was frozen in liquid nitrogen for GAG assays. For pimonidazole analysis, animals received an intraperitoneal injection of pimonidazole hydrochloride (60 mg/kg, Hypoxyprobe, Burlington, MA) 1 hour before sacrifice.

Alcian blue staining

5- μm thick sections of embedded tumors were cut and adhered to poly-L-lysine-coated microscope slides. After dewaxing and rehydration, slides were stained by Alcian blue (pH 1) to visualize PGs, counterstained by nuclear red, after which coverslips were fixed. Staining was detected, and images were recorded using a slide scanner (X20, Zeiss AxioScan Z1, ZEN software, Oberkochen, Germany).

Pimonidazole staining

5- μm thick sections of embedded tumors were cut and adhered to poly-L-Lysine-coated microscope slides. After dewaxing and rehydration of tumor slices, antigens were retrieved (boiling tris: 10 mM, pH 6), and slides were placed into the InsituPro VSi robot (Intavis bioanalytical instruments, Köln, Germany). Endogenous peroxidases were quenched (H_2O_2 : 0.3%, 30 min) and saturated (bovine serum albumin: 1%, 1 h). Slides were then incubated with a primary antibody (anti-pimonidazole: mouse monoclonal antibody, 1/300, 1h, room temperature; Hypoxyprobe). Biotinylated secondary antibody

(1/500, bovine serum albumin 0.1%, 1 h; Vector Laboratories, San Francisco, CA) was used to reveal the first antibody. Biotin was then complexed with streptavidin-coupled horseradish peroxidase (1/500, 30 min; Vector Laboratories). Peroxidase was detected using tyramide signal amplification (TSA) as per manufacturer's instructions (TSA-Alexa488; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Then, nuclei were counterstained with Hoechst (33342), and coverslips were fixed. Emitted fluorescences (461 nm for Hoechst and 519 nm for TSA) were imaged and recorded as previously (X20, Zeiss AxioScan Z1, ZEN software).

GAG assay

Samples ($n = 10$) were weighed (20-50 mg) and incubated overnight at 65°C in 1 mL of a papain extraction buffer and then centrifuged (1000 g, 10 min). Sulfated GAG content was determined using a Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay kit (Biocolor Ltd, Carrickfergus, UK) as per manufacturer's instructions. Absorbance was measured at 656 nm using Thermo Scientific Multiskan GO device (Thermo Fisher Scientific). Experiments were performed in duplicates.

2.5 | Statistical analyses

Statistical analyses were performed on Prism software version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). For in vivo and ex vivo studies, data were presented as individual values with mean \pm SD. Data normal distributions were verified with Shapiro-Wilk tests before performing Student t tests. For in vivo imaging quantification, paired Student t tests were applied; and for ex vivo analyses, unpaired Student t tests were performed. Results were considered significant at $P < .05$ ($*P < .05$, $**P < .01$, $***P < .001$, $****P < .0001$). Significance of results was verified with a Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

3 | RESULTS

3.1 | GAG CEST, guanidyl CEST, and APT CEST on phantoms

GAG CEST effects were observed on the z-spectra of chondroitin 4-sulfate solutions (Figure 1A), and guanidyl and APT CEST effects were observed on that of protamine solutions (Figure 1C). The highest CEST effect offset for each moiety appeared at different chemical shifts: 0.75, 1.96, and 3.68 ppm for GAGs, guanidyl, and APT, respectively.

Linear relationships were found between CEST area under the curves and either the GAG concentration ($R^2 = 0.9845$)

or the pH ($R^2 = 0.8849$ and $R^2 = 0.8477$, for guanidyl* and APT* respectively). An increase in GAG concentration and in pH led to an increase of the CEST signal (Figure 1B,D). The relative variation of the ratio (reference pH at 7.2) increased from pH 6.8 to 7.7.

3.2 | Quantitative assessment of GAGs in CHS tumoral tissue

From signal analysis of GAGs by CEST MRI, a GAG concentration-related map (Figure 2A) was constructed. The signal from GAG was clearly evidenced within tumoral tissue and observed to be heterogeneously distributed. Regarding muscle, CEST MRI of GAGs was very low with area under the curve = 2.15 ± 1.88 as compared to 27.29 ± 8.38 in tumor ($P < .0001$; $n = 9$) (Figure 2B), leading to a tumor/muscle ratio of 23.35 ± 16.97

Nuclear imaging, evidenced a significantly ($P < .0001$; $n = 9$) higher uptake of the ^{99m}Tc -NTP 15-5 radiotracer in tumoral tissue (179.38 ± 38.39 kBq/mL) as opposed to muscle (35.07 ± 5.17 kBq/mL), leading to a tumor/muscle ratio of 5.11 ± 0.69 (Figure 2C,D). Four images of ^{99m}Tc -NTP 15-5 SPECT imaging are shown on Supporting Information Figure S3A.

Ex vivo experiments confirmed this high PG feature of CHS tissue. From biochemical assays, GAG concentration was demonstrated to be 6.33 ± 1.60 $\mu\text{g}/\text{mg}$ in the tumor, whereas it was only 0.41 ± 0.09 $\mu\text{g}/\text{mg}$ in the muscle ($P < .0001$) (Figure 2F). As illustrated on Figure 2E, tumoral tissue was strongly stained by Alcian blue, confirming its richness in GAGs.

3.3 | Quantitative assessment of pH and hypoxia in CHS tumoral tissue

Figure 3A shows both the anatomical and relative variation of the APT*/guanidyl* ratio images for 3 randomly chosen mice out of 7. The ratio was only calculated inside the tumor because it cannot be compared with muscle due to extra CEST signal coming from Cr and PCr. The CEST-based images highlighted a heterogeneous pH distribution inside the tumor.

Figure 3B displays a representative image of ^{18}F -FMISO PET. Whereas on this slice a clear difference between the tumor and the muscle was observed, this was no longer the case once the signal was integrated over the whole tumor (red dots on Figure 3C). At the group level ($n = 5$), the tumor mean signal (18.70 ± 10.54 kBq/mL) was different from the muscle's signal (8.60 ± 4.30 kBq/mL). However, the inter-individual variations, especially for the tumor, led to the absence of differences between both tissues. The 3 incidences

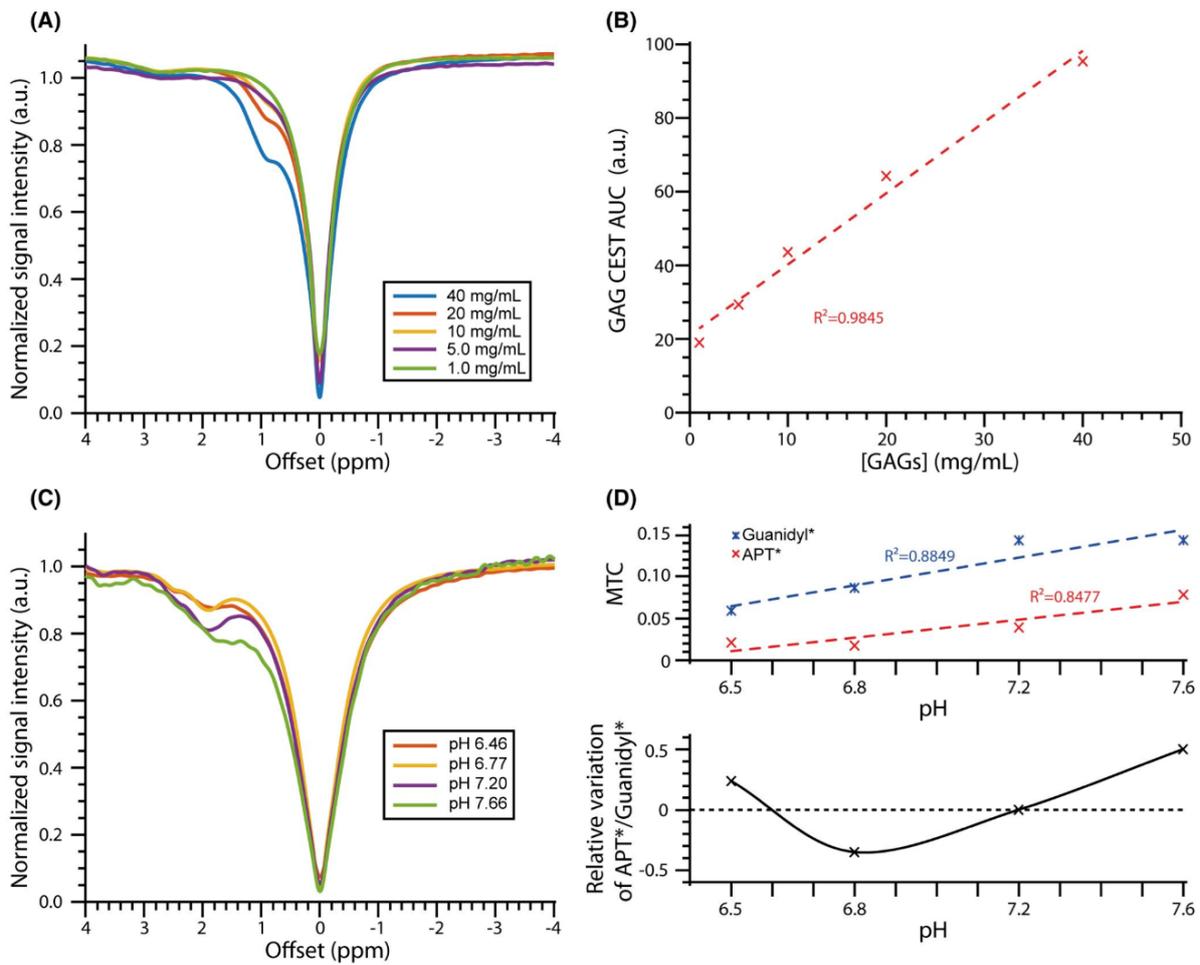


FIGURE 1 z-spectra of (A) chondroitin 4-sulfate and (C) protamine at several concentrations and pH, respectively. The CEST effects were estimated by measuring the AUC from 0.02 to 1.50 ppm for chondroitin 4-sulfate (GAG CEST) and the signal intensity at 1.96 and 3.60 for guanidyl* and APT* CEST, respectively. The relationship between CEST quantification and concentrations or pH are represented on panels (B) and (D), respectively. APT, amide proton transfer; AUC, area under the curve

of ^{18}F -FMISO PET imaging are shown on Supporting Information Figure S3B.

Ex vivo experiments by immunofluorescence with pimonidazole evidenced a weak staining within tumoral tissue, mainly localized in the center of CHS lobules (Figure 3D).

4 | DISCUSSION

This work aimed to develop in 1-scan multiple CEST MRI contrasts to characterize in vivo PG and hypoxic features of the CHS microenvironment. By exploiting the CEST frequency selectivity, we aimed to simultaneously image the PG concentration and pH as it relates to hypoxia. CEST MRI images were compared to current state-of-the-art imaging approaches, that is, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NTP 15-5 and ^{18}F -FMISO to map PGs and hypoxia, respectively. To the best of our knowledge,

this work is the first one to investigate the microenvironment of CHS by CEST MRI. In most published studies exploiting CEST MRI to image GAG concentration and pH, different saturation protocols are used. Both level and duration of the saturation RF trains are optimized depending on the exchangeable protons targeted. Typically, to image the hydroxyl moieties, the saturation pulse level is moderate, whereas the duration is long.^{39,40} For APT CEST, a variety of saturation conditions has been used.⁴¹ However, to maximize the APT effect, Zhou et al.⁴¹ recommend the usage of a saturation duration higher than 0.8 s and a level of around 2 μT . Our experimental conditions were close to the optimal ones for the different contrasts. Because we wanted to image both tumor features in a single acquisition, we chose to use a long saturation train ($t_{\text{sat}} = 4$ s) with moderate power ($B_1 = 1.5$ μT) that was demonstrated from phantom experiments to be a satisfactory compromise. Indeed, the GAG CEST effect

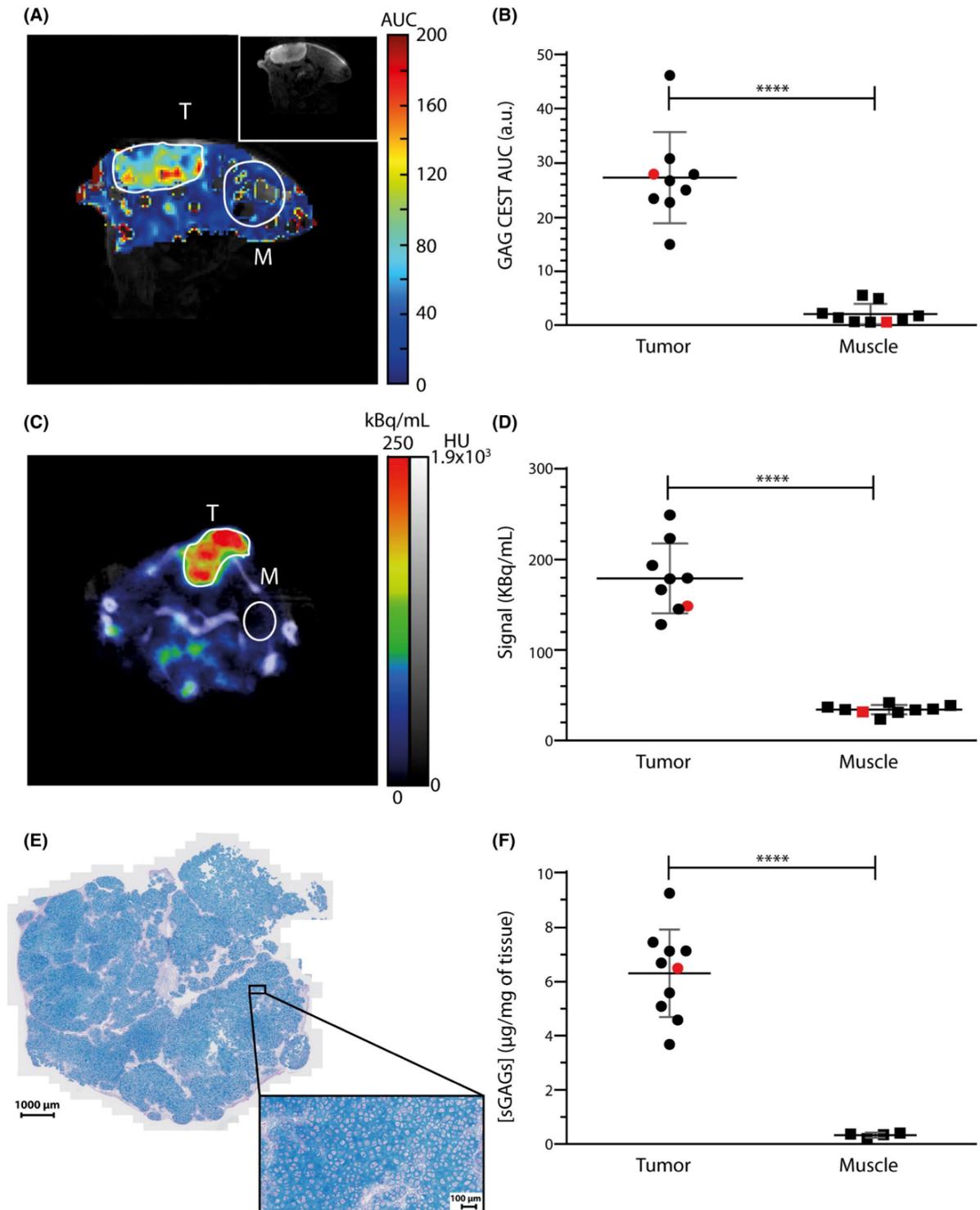


FIGURE 2 In vivo multimodal imaging of GAGs in Swarm rat CHS-bearing mice (A) GAG CEST parametric image. To clearly identify the tumor, the high-resolution image was added inside the inset. (C) SPECT-CT imaging with ^{99m}Tc-NTP 15-5. ROI quantitative analysis of GAG CEST and SPECT-CT are presented in (B) and (D), respectively. (E) Ex vivo tumor slice (×20 magnification) stained with both Alcian blue and nuclear red. Data were presented by individual values with mean ± SD. Paired *t* test and unpaired *t* test (*****P* < .0001) were applied for in vivo and ex vivo quantifications, respectively. Red data points on panels (B), (D), and (F) correspond to the images shown in (A), (C), and (E), respectively. CHS, chondrosarcoma; M, muscle; ROI, region of interest; SPECT, single photon emission computed tomography; T, tumor

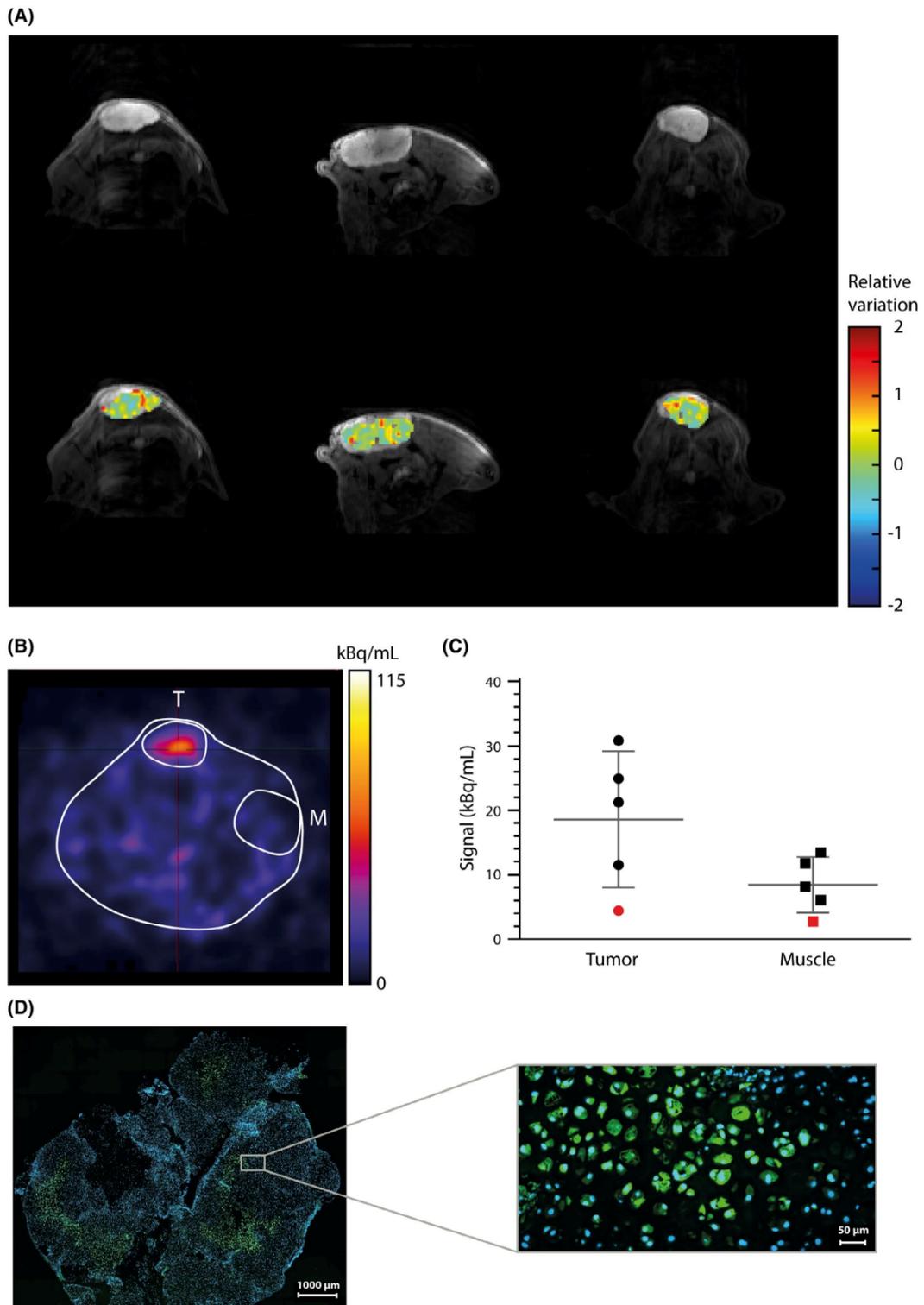


FIGURE 3 In vivo multimodal imaging of pH acidification (MRI) and hypoxia (PET) in Swarm rat CHS-bearing mice. (A) High resolution and relative variation of APT*/guanidyl* ratio images for 3 representative mice. (B) PET imaging with ^{18}F -FMISO. ROI quantitative analysis of PET is presented in (C). (D) Ex vivo tumor slice ($\times 20$ magnification) stained with pimonidazole and Hoechst. Data were presented by individual values with mean \pm SD. Paired t test ($*P = .0164$) were applied for in vivo quantifications. Red data points on panels (C) correspond to the image shown in (B)

was not too broad and did not overlap with the guanidyl one. Obviously, this compromise on the saturation parameters is at the cost of the optimized sensitivity for each CEST effect. Carefully choosing the saturation frequencies made it possible to simultaneously assess PGs (GAG CEST) and pH (guanidyl and APT CEST). In vitro, we can note that we found an increase of the guanidyl* signal such as Oskolkov et al.,⁴² whereas Jin et al.³⁴ observed an opposite trend. This discrepancy can be due to: 1) our multiple-contrast CEST conditions because experimental conditions were not set to the optimal values to maximize the CEST effect for pH and/or 2) physical parameters because especially the chemical exchange rate constant is not comparable to what was simulated in the other study. To obtain a pH variation independent of protein concentration, the ratio of the APT* and guanidyl* CEST was calculated.

In vivo GAG CEST images were obtained by acquiring signals resulting from the chemical exchange of the abundant hydroxyl groups in GAGs. A 23-times higher CEST effect was observed for the tumor compared to muscle demonstrating the high PG density in the CHS microenvironment. CEST signal studies of different forms of GAGs typically found in articular cartilage recently demonstrated that the CEST effect arises mainly from chondroitin 4-sulfate.⁴³ Swarm rat CHS was demonstrated to highly express aggrecan, which is composed of a core protein with covalently attached side chains of linear GAGs, including a high number of chondroitin sulfate, especially chondroitin 4-sulfate.⁴⁴ The GAG CEST approach was combined with ^{99m}Tc-NTP 15-5 nuclear imaging, a radiotracer designed to target negatively charged molecules of GAGs.^{16,45} As expected, a higher radiotracer accumulation was observed in tumor in respect to muscle (ratio ~5), confirming the higher PG concentration measured by GAG CEST. The discrepancies in the tumor to muscle ratios between the MRI and nuclear imaging can be explained by the poor vascularization of the tumor, thereby limiting the delivery of the radiotracer. Because CEST MRI provided signals from hydroxyl moieties of PGs, we also have to consider that hydroxyl moieties are found in other molecules such as glucose or lactate.^{46,47} We therefore were interested to complete GAG CEST with ¹H MRS to identify their respective contribution in the CEST signal. Unfortunately, due to its high chondrogenic structure, CHS tissue did not provide enough resolution on the MRS spectrum. Finally, ex vivo quantitative analysis, that is, GAG assays, reinforced the in vivo multimodal imaging results and evidenced high PG concentration within tumoral tissue (ratio tumor/muscle ~18, that is, in between SPECT and CEST ratios).

CEST MRI assessment of intratumoral pH variations was performed by exploiting both guanidyl and amide to enhance the sensitivity of pH-weighted MRI.³⁴ Because acidosis is associated to hypoxia,⁴⁸ it was expected that mapping tumoral pH through CEST MRI would be a

relevant methodology to delineate areas of hypoxic and well-oxygenated cells within tumoral tissue. The CEST signals from both chemical groups were assigned to proteins. To have a map independent from protein concentration, the APT*/guanidyl* ratio was calculated inside the tumor. This approach assumes that the guanidyl signal is coming only from the proteins. This hypothesis is acceptable for tumors, although it cannot be applied to other tissues, especially muscle, due to the presence of Cr and PCr. These metabolites give a guanidyl signal, the APT*/guanidyl* ratio will depend on both pH and the metabolite concentrations. In vivo ¹⁸F-FMISO PET imaging confirmed the hypoxic status of CHS because the mean tumor/muscle ratio value was approximately 2. However, at the group level there was no statistical difference between the 2 tissues due to large inter-individual variations. Ex vivo immunofluorescence with pimonidazole evidenced that hypoxic areas were heterogeneously distributed throughout the tumoral tissue similarly to CEST MRI.

The assessment of pH by APT CEST is debated in the literature. Some authors reported a decrease of the CEST effect on the pH,^{49,50} whereas others observed the opposite.^{51,52} Most of these APT CEST effects were obtained after performing the so-called magnetization transfer ratio asymmetry analysis. The key assumption in this data processing is that for negative offsets, only the direct water saturation effect is recorded.⁵³ However, it was shown in vivo that several nuclear Overhauser enhancement exchanges were recorded in the region of ~-1 to -4 ppm, no longer fulfilling the magnetization transfer ratio asymmetry assumption.⁵⁴ Nevertheless, most of these studies used this estimator. To avoid the interference of the nuclear Overhauser enhancement on our CEST quantifications, our data were analyzed using the approach inspired by Jin et al.²⁰ and described in section 2.3.1.

5 | CONCLUSION

To conclude, our work on Swarm rat CHS bearing mice demonstrated the potential of imaging the different tumoral microenvironment properties by a single CEST MRI acquisition. MRI presents the main advantage when compared to nuclear imaging to give high-resolution spatial information. It is then possible to delineate accurately the metabolism-related region of interest. Such parametric maps would allow a better understanding of the relationship between tumor cells and their environment, thus becoming a prerequisite to develop more individualized therapies.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Christelle Damon-Soubeyrand (Anipath facility) for precious technical help with histological equipment.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data and code are available upon request.

ORCID

Roxane Autissier  <https://orcid.org/0000-0001-5522-6814>

Leslie Mazuel  <https://orcid.org/0000-0002-0180-871X>

Elise Maubert  <https://orcid.org/0000-0002-9001-9690>

Jean-Marie Bonny  <https://orcid.org/0000-0003-2858-7459>

Philippe Auzeloux  <https://orcid.org/0000-0003-2066-3904>

Sébastien Schmitt  <https://orcid.org/0000-0002-8468-6788>

Amidou Traoré  <https://orcid.org/0000-0002-3574-3475>

Caroline Peyrode  <https://orcid.org/0000-0002-0455-7047>

Elisabeth Miot-Noirault  <https://orcid.org/0000-0002-8372-6602>

<https://orcid.org/0000-0002-8372-6602>

Guilhem Pagés  <https://orcid.org/0000-0001-9368-5237>

<https://orcid.org/0000-0001-9368-5237>

REFERENCES

1. *Key Statistics for Bone Cancer: Key Statistics About Bone Cancer*. American Cancer Society Web site. Available at: <https://www.cancer.org/cancer/bone-cancer/about/key-statistics.html>. Updated January 12, 2021. Accessed January 22, 2021.
2. World Health Organization WHO, Fletcher C, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F. WHO classification of tumours of soft tissue and bone. In: *WHO Classification of Tumours*, vol. 5. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2013. pp 264-268.
3. Gelderblom H, Hogendoorn PCW, Dijkstra SD, et al. The clinical approach towards chondrosarcoma. *Oncologist*. 2008;13:320-329.
4. Mery B, Espenel S, Guy J-B, et al. Biological aspects of chondrosarcoma: leaps and hurdles. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;126:32-36.
5. Angelini A, Guerra G, Mavrogenis AF, Pala E, Picci P, Ruggieri P. Clinical outcome of central conventional chondrosarcoma. *J Surg Oncol*. 2012;106:929-937.
6. van Oosterwijk JG, Anninga JK, Gelderblom H, Cleton-Jansen A-M, Bovée JVMG. Update on targets and novel treatment options for high-grade osteosarcoma and chondrosarcoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013;27:1021-1048.
7. Nazeri E, Gouran Savadkoobi M, Majidzadeh-A K, Esmaeili R. Chondrosarcoma: an overview of clinical behavior, molecular mechanisms mediated drug resistance and potential therapeutic targets. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;131:102-109.
8. Yeldag G, Rice A, Del Río HA. Chemoresistance and the self-maintaining tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2018;10:471.
9. de Davies C, Berk DA, Pluen A, Jain RK. Comparison of IgG diffusion and extracellular matrix composition in rhabdomyosarcomas grown in mice versus in vitro as spheroids reveals the role of host stromal cells. *Br J Cancer*. 2002;86:1639-1644.
10. Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99:1441-1454.
11. Skeletal Lesions Interobserver Correlation among Expert Diagnosticians (SLICED) Study Group. Reliability of histopathologic and radiologic grading of cartilaginous neoplasms in long bones. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89:2113-2123.
12. Murphey MD, Walker EA, Wilson AJ, Kransdorf MJ, Temple HT, Gannon FH. From the archives of the AFIP: imaging of primary chondrosarcoma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*. 2003;23:1245-1278.
13. Logie CI, Walker EA, Forsberg JA, Potter BK, Murphey MD. Chondrosarcoma: a diagnostic imager's guide to decision making and patient management. *Semin Musculoskelet Radiol*. 2013;17:101-115.
14. Jo I, Gould D, Schlicht S, Taubman K, Choong P. Diagnostic accuracy of functional imaging modalities for chondrosarcoma: a systematic review and meta-analysis. *J Bone Oncol*. 2019;19:100262.
15. Miot-Noirault E, Gouin F, Vidal A, et al. First preclinical imaging of primary cartilage neoplasm and its local recurrence using ^{99m}Tc-NTP 15-5 radiotracer. *J Nucl Med*. 2009;50:1541-1547.
16. Peyrode C, Gouin F, Vidal A, et al. A "Proteoglycan targeting strategy" for the scintigraphic imaging and monitoring of the swarm rat chondrosarcoma orthotopic model. *Sarcoma*. 2011;2011:691608.
17. Miot-Noirault E, Vidal A, Auzeloux P, Peyrode C, Madelmont J-C, Chezal J-M. In vivo scintigraphic imaging of proteoglycans. *Methods Mol Biol*. 2012;836:183-198.
18. Rajendran JG, Mankoff DA, O'Sullivan F, et al. Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by [18F] Fluoromisonidazole and [18F]Fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res*. 2004;10:2245-2252.
19. Goldenberg JM, Pagel MD. Assessments of tumor metabolism with CEST MRI. *NMR Biomed*. 2019;32:e3943.
20. Jin T, Wang P, Zong X, Kim S-G. MR imaging of the amide-proton transfer effect and the pH-insensitive nuclear Overhauser effect at 9.4 T. *Magn Reson Med*. 2013;69:760-770.
21. Zhou Y, van Zijl PCM, Xu X, et al. Magnetic resonance imaging of glycogen using its magnetic coupling with water. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117:3144-3149.
22. Jones KM, Pollard AC, Pagel MD. Clinical applications of chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI. *J Magn Reson Imaging*. 2018;47:11-27.
23. Kogan F, Hariharan H, Reddy R. Chemical exchange saturation transfer (CEST) imaging: description of technique and potential clinical applications. *Curr Radiol Rep*. 2013;1:102-114.
24. van Zijl PCM, Yadav NN. Chemical exchange saturation transfer (CEST): what is in a name and what isn't? *Magn Reson Med*. 2011;65:927-948.
25. Wu B, Warnock G, Zaiss M, et al. An overview of CEST MRI for non-MR physicists. *EJNMMI Phys*. 2016;3:19.
26. Dou W, Lin C-Y, Ding H, et al. Chemical exchange saturation transfer magnetic resonance imaging and its main and potential applications in pre-clinical and clinical studies. *Quant Imaging Med Surg*. 2019;9:1747-1766.
27. Ling W, Regatte RR, Navon G, Jerschow A. Assessment of glycosaminoglycan concentration in vivo by chemical exchange-dependent saturation transfer (gagCEST). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:2266-2270.
28. Brinkhof S, Nizak R, Khlebnikov V, Prompers JJ, Klomp DWJ, Saris DBF. Detection of early cartilage damage: feasibility and potential of gagCEST imaging at 7T. *Eur Radiol*. 2018;28:2874-2881.
29. Krusche-Mandl I, Schmitt B, Zak L, et al. Long-term results 8 years after autologous osteochondral transplantation: 7 T gagCEST and sodium magnetic resonance imaging with morphological and clinical correlation. *Osteoarthr Cartil*. 2012;20:357-363.
30. Krishnamoorthy G, Nanga RPR, Bagga P, Hariharan H, Reddy R. High quality 3D gagCEST imaging of in vivo human knee cartilage at 7T. *Magn Reson Med*. 2017;77:1866-1873.

31. Wei W, Lambach B, Jia G, Kaeding C, Flanigan D, Knopp MV. A phase I clinical trial of the knee to assess the correlation of gag-CEST MRI, delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage and T2 mapping. *Eur J Radiol.* 2017;90:220-224.
32. Corbet C, Feron O. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. *Nat Rev Cancer.* 2017;17:577-593.
33. Chen LQ, Pagel MD. Evaluating pH in the extracellular tumor microenvironment using CEST MRI and other imaging methods. *Adv Radiol.* 2015;2015:1-25.
34. Jin T, Wang P, Hitchens TK, Kim S-G. Enhancing sensitivity of pH-weighted MRI with combination of amide and guanidyl CEST. *Neuroimage.* 2017;157:341-350.
35. Maloney E, Wang Y-N, Vohra R, et al. Magnetic resonance imaging biomarkers for pulsed focused ultrasound treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2020;26:904-917.
36. Loi L, Zimmermann F, Goerke S, et al. Relaxation-compensated CEST (chemical exchange saturation transfer) imaging in breast cancer diagnostics at 7T. *Eur J Radiol.* 2020;129:109068.
37. Kim M, Gillen J, Landman BA, Zhou J, van Zijl PCM. Water saturation shift referencing (WASSR) for chemical exchange saturation transfer (CEST) experiments. *Magn Reson Med.* 2009;61:1441-1450.
38. Vidal A, Gaumet V, Galmier M-J, et al. Development of a freeze-dried kit formulation for the preparation of ^{99m}Tc-NTP 15-5, a radiotracer for scintigraphic imaging of proteoglycans. *Appl Radiat Isot.* 2015;101:1-9.
39. Zhou Z, Bez M, Tawackoli W, et al. Quantitative chemical exchange saturation transfer MRI of intervertebral disc in a porcine model. *Magn Reson Med.* 2016;76:1677-1683.
40. Nasrallah FA, Pagès G, Kuchel PW, Golay X, Chuang K-H. Imaging brain deoxyglucose uptake and metabolism by gluco-CEST MRI. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33:1270-1278.
41. Zhou J, Heo H-Y, Knutsson L, van Zijl PCM, Jiang S. APT-weighted MRI: techniques, current neuro applications, and challenging issues. *J Magn Reson Imaging.* 2019;50:347-364.
42. Oskolkov N, Bar-Shir A, Chan KWY, et al. Biophysical characterization of human protamine-1 as a responsive CEST MR contrast agent. *ACS Macro Lett.* 2015;4:34-38.
43. Einarsson E, Peterson P, Önnérjörd P, et al. The role of cartilage glycosaminoglycan structure in gagCEST. *NMR Biomed.* 2020;33:e4259.
44. Choi HU, Meyer K, Swarm R. Mucopolysaccharide and protein-polysaccharide of a transplantable rat chondrosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68:877-879.
45. Miot-Noirault E, Gouin F, Vidal A, et al. First preclinical imaging of primary cartilage neoplasm and its local recurrence using ^{99m}Tc-NTP 15-5 radiotracer. *J Nucl Med.* 2009;50:1541-1547.
46. Walker-Samuel S, Ramasawmy R, Torrealdea F, et al. In vivo imaging of glucose uptake and metabolism in tumors. *Nat Med.* 2013;19:1067-1072.
47. DeBrosse C, Nanga RPR, Bagga P, et al. Lactate chemical exchange saturation transfer (LATEST) imaging in vivo a biomarker for LDH activity. *Sci Rep.* 2016;6:19517.
48. Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouysségur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med.* 2010;14:771-794.
49. Schüre JR, Shrestha M, Breuer S, et al. The pH sensitivity of APT-CEST using phosphorus spectroscopy as a reference method. *NMR Biomed.* 2019;32:e4125.
50. Wang E, Wu Y, Cheung JS, et al. Mapping tissue pH in an experimental model of acute stroke—determination of graded regional tissue pH changes with non-invasive quantitative amide proton transfer MRI. *Neuroimage.* 2019;191:610-617.
51. Krikken E, van der Kemp WJM, Khlebnikov V, et al. Contradiction between amide-CEST signal and pH in breast cancer explained with metabolic MRI. *NMR Biomed.* 2019;32:e4110.
52. Schmidt H, Schwenzer NF, Gatidis S, et al. Systematic evaluation of amide proton chemical exchange saturation transfer at 3 T: Effects of protein concentration, pH, and acquisition parameters. *Invest Radiol.* 2016;51:635-646.
53. Liu G, Song X, Chan KWY, McMahon MT. Nuts and bolts of chemical exchange saturation transfer MRI. *NMR Biomed.* 2013;26:810-828.
54. Zhang X-Y, Wang F, Li H, et al. Accuracy in the quantification of chemical exchange saturation transfer (CEST) and relayed nuclear Overhauser enhancement (rNOE) saturation transfer effects. *NMR Biomed.* 2017;30:e3716.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section.

FIGURE S1 Tumoral volumes measured by MRI at 15-16 days post-induction and presented as individual values with mean \pm SD. Averaged volume $215.04 \pm 86.28 \text{ mm}^3$

FIGURE S2 Representative data obtained in vivo for a ROI positioned in (blue) the tumor and (red) the muscle. (A) Mean z-spectra for all animals; dotted lines represent \pm 1SD. (B) z-spectra of a representative animal; dotted lines represent the linear baselines applied for guanidyl (from 1.66 to 2.30 ppm) and APT CEST (from 3.36 to 3.78 ppm) analyses. (C) Lorentzian fit of the GAG CEST from the z-spectra shown in (B)

FIGURE S3 (A) ^{99m}Tc-NTP 15-5 SPECT-CT image of a representative animal. From left to right: axial slice with tumor, coronal slice with tumor, coronal slice with radiotracer body dispersion and sagittal slice with tumor and radiotracer body dispersion. The areas are annotated T for tumor, M for muscle, B for bladder and Li for liver. (B) ¹⁸F-FMISO PET image of a representative animal. From left to right: axial slice with tumor, coronal and sagittal slices with tumor and radiotracer body dispersion. The areas were annotated T for tumor, M for muscle, DT for digestive tract. Orientations were annotated A for anterior, D for dorsal, L for left, P for posterior, R for right and V for ventral

TABLE S1 Overview of the experimental design and analysis by in vivo modality

How to cite this article: Autissier R, Mazuel L, Maubert E, et al. Simultaneous proteoglycans and hypoxia mapping of chondrosarcoma environment by frequency selective CEST MRI. *Magn Reson Med.* 2021;00:1–11. <https://doi.org/10.1002/mrm.28781>

Supporting Information

Simultaneous proteoglycans and hypoxia mapping of chondrosarcoma environment by frequency selective CEST MRI

Roxane Autissier^{1,2,3}; Leslie Mazuel^{1,2,3}; Elise Maubert²; Jean-Marie Bonny^{1,3}; Philippe Auzeloux²; Sébastien Schmitt²;
Amidou Traoré^{1,3}; Caroline Peyrode²; Elisabeth Miot-Noirault² & Guilhem Pagès^{1,3}

¹INRAE, UR QuaPA, F-63122 Saint-Gènes-Champanelle, France

²Université Clermont Auvergne, INSERM, U1240 Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, F-63000 Clermont Ferrand, France

³INRAE, ISC AgroResonance, F-63122 Saint-Gènes-Champanelle, France

Correspondence: Roxane Autissier, PhD student

UMR 1240 IMoST INSERM, Université Clermont Auvergne

58, rue Montalembert, 63005 Clermont-Ferrand, France

e-mail : Roxane.Autissier@uca.fr

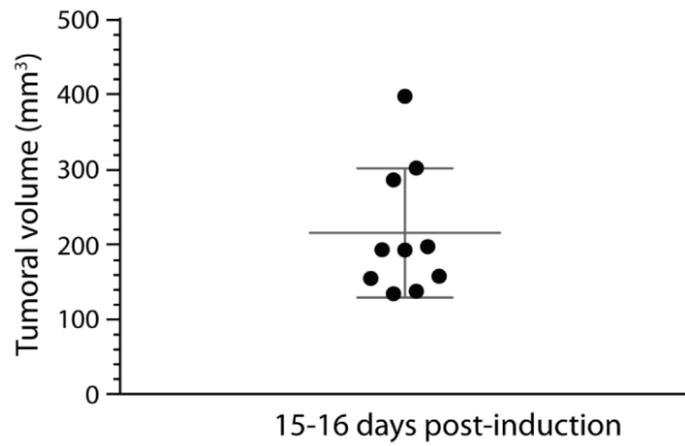
Grant: Ligue Contre le Cancer Auvergne - Rhône - Alpes, project R16146C

Supporting Information

Supporting Information Table S1: Overview of the experimental design and analysis by in vivo modality.

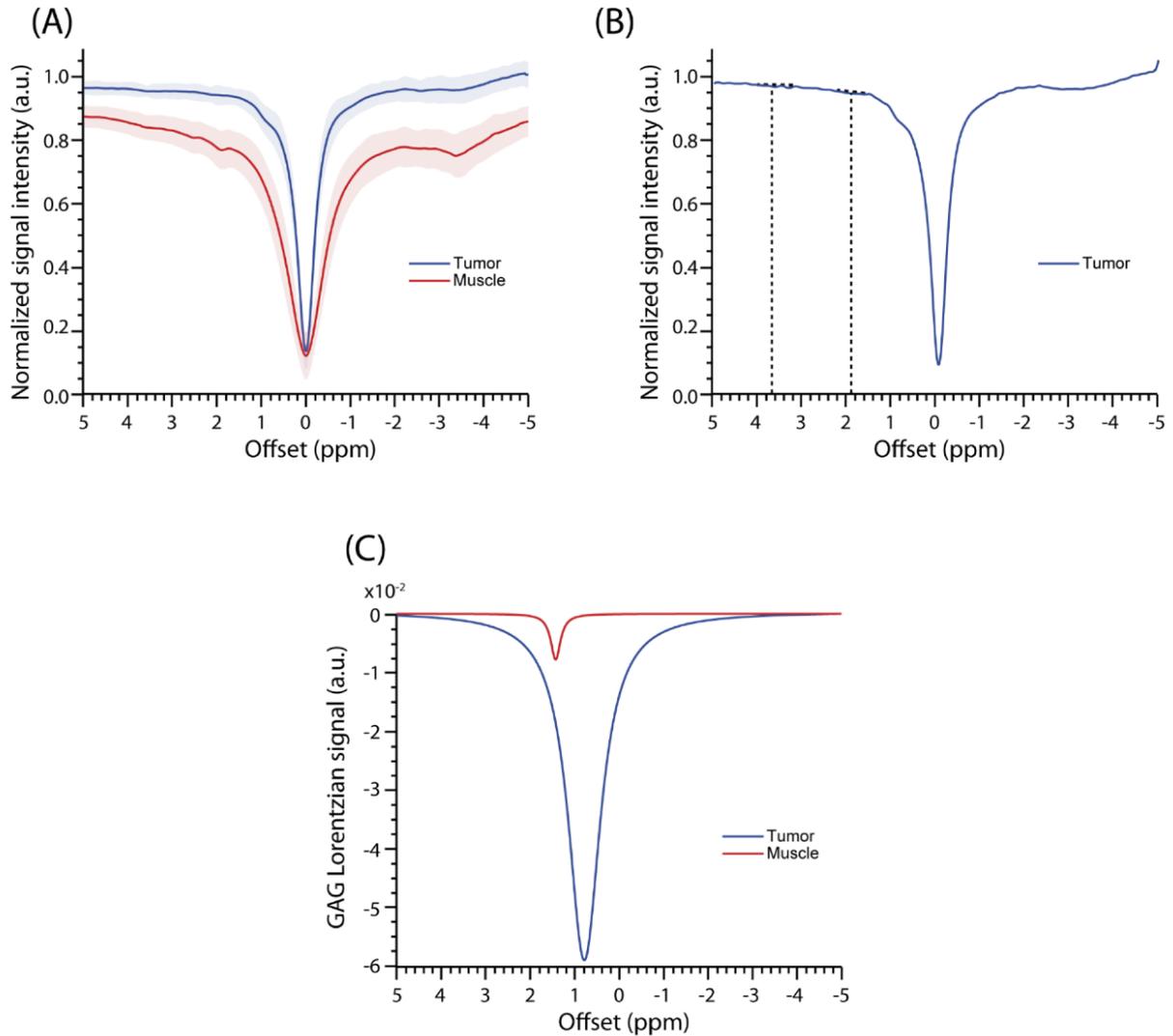
In vivo imaging methods	Number of scanned animals	Number of analyzed animals	Reasons for removals
^{99m}Tc-NTP 15-5	10	9	- 1 mouse without signal (radioactivity too low)
¹⁸F-FMISO	10	5	- 4 mice without signal (radioactivity too low) - 1 mouse moved during acquisition
CEST MRI	10	- GAG CEST: 9 - APT*/Guanidyl* CEST: 7	- B ₀ could not be corrected for one mouse (problem with WASSR acquisition) - 2 mice presented an important B ₀ shift leading to the absence of signal for the APT analysis

Supporting Information



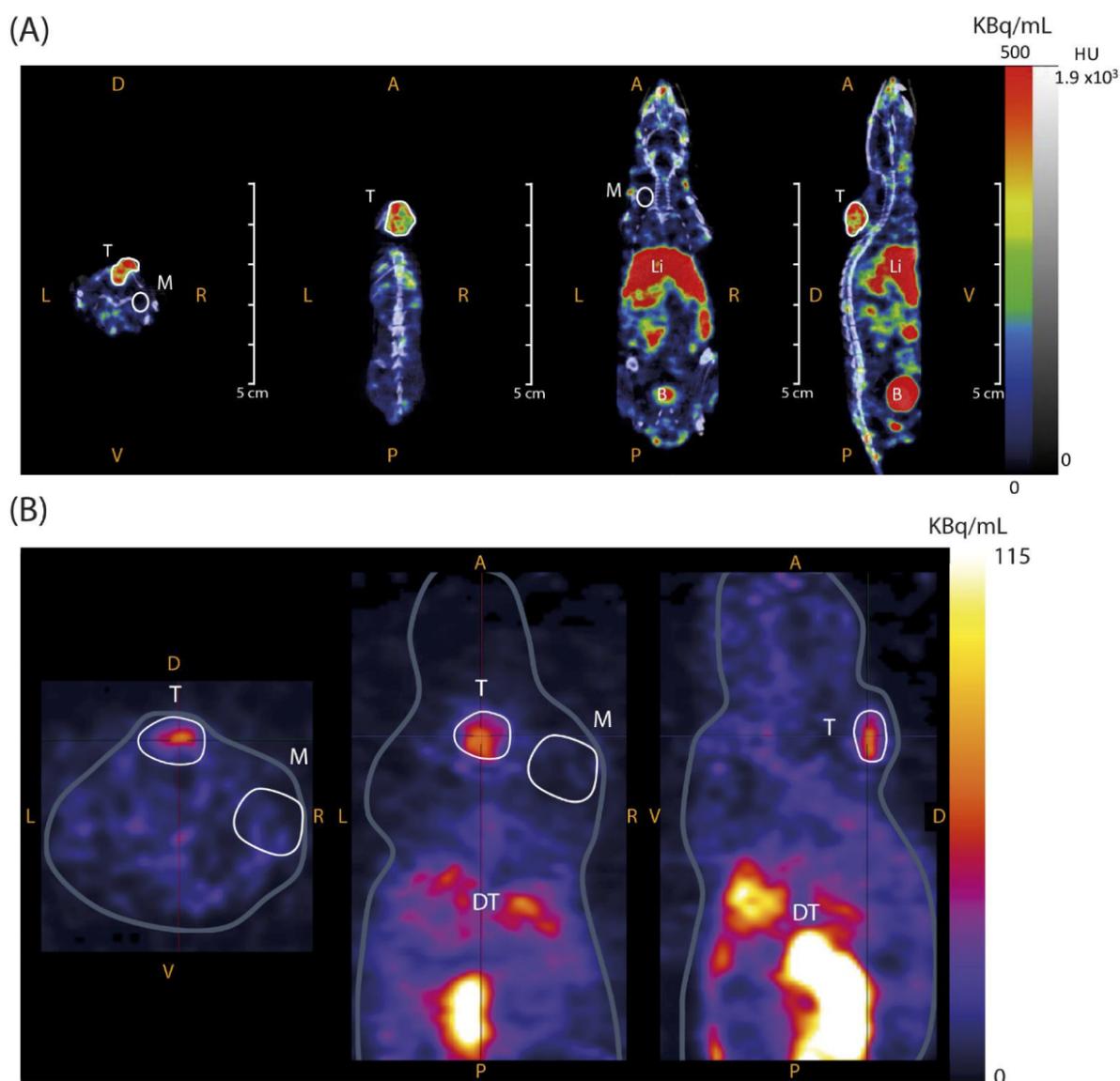
Supporting Information Figure S1: Tumoral volumes measured by MRI at 15-16 days post-induction and presented as individual values with mean \pm SD. Averaged volume 215.04 ± 86.28 mm³.

Supporting Information



Supporting Information Figure S2: Representative data obtained *in vivo* for a ROI positioned in (blue) the tumor and (red) the muscle. (A) Mean z-spectra for all animals; dotted lines represent ± 1 SD. (B) z-spectra of a representative animal; dotted lines represent the linear baselines applied for guanidyl (from 1.66 to 2.30 ppm) and APT CEST (from 3.36 to 3.78 ppm) analyses. (C) Lorentzian fit of the GAG CEST from the z-spectra shown in (B).

Supporting Information



Supporting Information Figure S3: (A) ^{99m}Tc -NTP 15-5 SPECT-CT image of a representative animal. From left to right: axial slice with tumor, coronal slice with tumor, coronal slice with radiotracer body dispersion and sagittal slice with tumor and radiotracer body dispersion. The areas are annotated T for tumor, M for muscle, B for bladder and Li for liver. (B) ^{18}F -FMISO PET image of a representative animal. From left to right: axial slice with tumor, coronal and sagittal slices with tumor and radiotracer body dispersion. The areas were annotated T for tumor, M for muscle, DT for digestive tract. Orientations were annotated A for anterior, D for dorsal, L for left, P for posterior, R for right and V for ventral.

II) Présentation de l'article « Bimodality imaging as a companion of antitumor efficacy of TH-302 in experimental chondrosarcoma »

Pour atteindre le second objectif de ma thèse, j'ai suivi, en utilisant la même approche multimodale, l'évolution du microenvironnement tumoral au cours du temps et évalué l'effet d'un traitement. Ces résultats nous ont permis de rédiger un second article qui sera très prochainement soumis auprès du journal *Theranostics*.

A) Contexte et objectifs de l'étude

Les propriétés du microenvironnement tumoral sont responsables de la résistance thérapeutique dans plusieurs types de cancer, dont le chondrosarcome. Pour ce dernier, la matrice extracellulaire dense de type chondrogénique ainsi que la présence de faibles taux d'oxygénation au centre des lobules tumoraux rendent difficile la diffusion des agents chimiothérapeutiques au sein du tissu. De plus, l'hétérogénéité du microenvironnement et son probable remaniement au cours du développement de la pathologie, ajoutent un niveau de complexité supplémentaire à sa prise en charge thérapeutique.

Dans ce contexte, nous avons voulu évaluer la pertinence d'une approche par imagerie multimodale pour caractériser et suivre les différents remaniements moléculaires, au sein du microenvironnement tumoral, au cours du temps. Nous avons également évalué l'action d'une prodrogue activable en hypoxie sur le métabolisme des cellules tumorales et sur le microenvironnement du chondrosarcome.

B) Méthodes

Cette étude est menée chez le rat porteur d'un chondrosarcome SWARM. Pour cela, un fragment de chondrosarcome SWARM de rat est implanté en paratibial chez des rats sains. De j+4 à j+35 post-implantation, le microenvironnement tumoral a été exploré par une approche d'imagerie multimodale. Le traitement à base d'une prodrogue activable en hypoxie, l'évofosfamide ou TH-302, a été appliqué de j+11 à j+22 post-implantation.

L'exploration de la matrice extracellulaire s'est faite *in vivo* par TEMP au [^{99m}Tc]NTP 15-5 et par gagCEST ; puis *ex vivo* par dosage biochimique des GAGs et par coloration histologique au bleu alcian à j+35. Pour étudier la fraction hypoxique et l'acidification du microenvironnement tumoral, des imageries TEP au [¹⁸F]FMISO ont été réalisées, mais aussi des imageries par IRM CEST avec l'évaluation du ratio de contraste APT / GuanidyCEST. À l'issue du suivi en imagerie, des immunomarquages au

pimonidazole ont été réalisés *ex vivo* sur des coupes de tissus fixés afin de quantifier le nombre de cellules hypoxiques.

Nous avons choisi également de réaliser un suivi par IRM multiparamétrique, en évaluant les variations T_2 et d'ADC au cours du temps, afin d'évaluer l'impact du traitement sur la structure du tissu tumoral. Le métabolisme glucidique et la prolifération ont été investigués par imageries TEP au [^{18}F]FDG et *ex vivo* grâce à des immunomarquages de GLUT1 et Ki-67.

Enfin, dans le but d'évaluer l'impact direct, au niveau cellulaire, du cytotoxique alkylant qu'est le TH-302, une coloration à l'hématoxyline éosine ainsi qu'une immunohistochimie au $\gamma\text{-H2AX}$, biomarqueur des cassures double brin de l'ADN, ont été également réalisées.

C) Principaux résultats

Le TH-302 a un effet anti-tumoral sur le modèle SWARM implanté chez le rat. En effet, une réduction significative du volume tumoral a été observée avec le traitement, et ce, quel que soit la méthode de mesure (pied à coulisse ou IRM). Au niveau cellulaire, dans les tumeurs traitées, des diminutions significatives de la cellularité mais aussi du nombre de cellules prolifératives ont été mises en évidence, respectivement, par la coloration hématoxyline-éosine et l'immunomarquage Ki-67. De plus, une augmentation significative du pourcentage de cellules comportant des cassures double brin de l'ADN a été observée au sein des tumeurs traitées grâce au marquage $\gamma\text{-H2AX}$.

Le TH-302 induit des modifications microstructurales au niveau des tumeurs traitées. En effet, alors que dans le groupe contrôle, les valeurs d'ADC et de T_2 augmentent, celles dans le groupe traité restent stables au cours du temps. Des différences significatives sont d'ailleurs observées entre les deux groupes.

Le TH-302 réduit également le métabolisme glucidique tumoral chez les rats traités et une différence significative entre les deux groupes est retrouvée *in vivo* en [^{18}F]FDG à un stade tardif. Cette différence est retrouvée *ex vivo* avec le marquage GLUT1.

Cette prodrogue activable en hypoxie a tendance à réduire également la fraction hypoxique à l'intérieur des tumeurs traitées mais du fait de l'hétérogénéité tumorale, aucune différence significative n'est observée lorsque le signal est moyenné sur la tumeur que ce soit en [^{18}F]FMISO ou avec le ratio APT / GuanidylCEST. Néanmoins, en exploitant la résolution spatiale de l'IRM CEST, une différence de distribution significative de ce ratio entre les deux groupes est observée pour le dernier jour. La majorité des voxels dans la tumeur des animaux traités au TH-302 ont des valeurs plus élevées, correspondant à un pH plus élevé que dans la tumeur des animaux contrôles.

Enfin, du point de vue de la matrice extracellulaire, le TH-302 induit des changements au niveau des protéoglycanes. Une augmentation significative est retrouvée dans les tumeurs traitées au

TH-302 *in vivo* en [^{99m}Tc]NTP 15-5 et *ex vivo* avec la coloration au bleu alcian et le dosage biochimique de GAGs. En revanche, aucune différence n'est observée en gagCEST entre le groupe traité et le groupe contrôle.

D) Principales conclusions

Cette stratégie d'imagerie multimodale nous a permis de suivre les remaniements moléculaires du microenvironnement tumoral du chondrosarcome au cours de son développement mais également de surveiller sa réponse thérapeutique au TH-302 sur de multiples aspects. Des cartographies résolutive mettant en lumière l'hétérogénéité tumorale ont été établies par IRM CEST. L'imagerie multimodale nous a offert la possibilité d'évaluer, au fil du temps et de manière non invasive, l'état structurel et matriciel, mais aussi métabolique et hypoxique, de la tumeur hétérogène qu'est le chondrosarcome.

Nous avons également démontré que cette molécule, prodrogue activable en hypoxie, est une excellente candidate pour une chimiothérapie efficace dans le traitement de ce cancer.

Bimodality imaging as a companion of antitumor efficacy of TH-302 in experimental chondrosarcoma

Authors: Roxane Autissier^{1,2,3}; Guilhem Pagés^{2,3}; Erwan Boutault¹; Jean-Marie Bonny^{2,3}; Sébastien Schmitt¹; Philippe Auzeloux¹; Aurélie Dutour⁴; Elisabeth Miot-Noirault¹; Leslie Mazuel^{1,2,3}

Affiliations:

¹Université Clermont Auvergne, Inserm, IMoST, F-63000 Clermont-Ferrand, France

²INRAE, UR QuaPA, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

³INRAE, AgroResonance facility, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

⁴Team Cell Death and Pediatric Cancer, Cancer Initiation and Tumor Cell Identity Department, INSERM1052, CNRS5286, Cancer Research Center of Lyon, F-69008 Lyon, France

Corresponding author: Leslie Mazuel

IMoST UMR 1240 INSERM / Université Clermont Auvergne
58, rue Montalembert, 63005 Clermont Ferrand Cedex, France

E-mail : leslie.mazuel@uca.fr

ABSTRACT

Rationale: The hypoxic status of cancer tumor is very disparate within tumor microenvironment. It is considered that this hypoxia heterogeneity is highly responsible for treatment resistance leading to the development of hypoxia-activated prodrugs (HAPs). Chondrosarcoma, a type of bone cancer, associates heterogenous microenvironment with hypoxia regions and a resistance to chemo- and radiotherapies. Therefore, we used an original multimodal imaging strategy to follow-up tumor microenvironment response to Evofosfamide (TH-302) HAP therapy on a preclinical SWARM rat chondrosarcoma model.

Methods: Bimodal imaging strategy consisted of nuclear imaging and MRI on two animal groups: TH-302 treated and untreated animals. First, to monitor TH-302 effects on tumor growth and structure, we measured T_2 and ADC by MRI and we used [^{18}F]FDG to explore tumor metabolism. Then [^{18}F]FMISO and APT to Guanidyl CEST ratio MRI evaluated hypoxic status with. Finally, extracellular matrix was explored *in vivo* by [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]NTP 15-5 and gagCEST MRI. At the end of the time course, histology, immunohistochemistry, immunofluorescence and biochemical assay were performed on the tumors to confirm *in vivo* observation (HES, Ki-67, GLUT1, γ -H2AX, pimonidazole, alcian blue staining and sulfated GAG (sGAG) assay)

Results: TH-302 showed a significant antitumor activity with a 75% reduction in tumor volume at the end of the protocol ($p < 0.0001$). Regarding cellularity and cell proliferation, HES and Ki-67 staining were also decreased ($p < 0.01$; $p < 0.05$, respectively). Chondrosarcoma microstructures were also modified with TH-302 therapy as indicated by T_2 and ADC progression ($p < 0.0001$ and $p < 0.01$, respectively). [^{18}F]FDG and GLUT1 staining showed a decrease of -22.5% and -45.0% in tumor metabolism, respectively. Moreover, pH values in treated tumors were higher than in control ones (APT to Guanidyl CEST ratio; $p < 0.05$) and hypoxic fraction was reduced too as observed with pimonidazole ($p < 0.01$). TH-302 had an impact on extracellular matrix with an increase in sGAG component as showed by [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]NTP 15-5 and sGAG assay ($p < 0.001$).

Conclusion: To our knowledge, it is the first time that TH-302 shows an *in vivo* antitumor activity in chondrosarcoma. Our multimodal imaging approach allow monitoring complex exchanges between tumor cells and their neighboring under therapy. This is key to improve the orientation of patients towards personalized medicine in oncology.

Keywords: CEST MRI, Chondrosarcoma, Evofosfamide, Nuclear imaging, Tumor microenvironment

INTRODUCTION

The concept of tumor microenvironment (TME) has raised considerable interest in translational research and emerged as one of the compulsory bases for a personalized medicine in oncology [1]. Understanding the dynamic and multiple exchanges between tumor cells and their neighboring microenvironment appears the cornerstone to overcome tumoral plasticity and patients' responsiveness to therapy. TME includes tumor cells, stroma with fibroblasts, endothelial and immune cells, as well as non-cellular component such as extracellular matrix with collagen and proteoglycans. Spatial heterogeneity of the TME in solid tumors leads to non-uniform spatial distribution of nutrients, growth factors and oxygen generating local niches of cells resistant to therapies [2,3]. Hypoxia, characterized by low oxygen/low pH, has emerged as one of the most important properties of TME, responsible of tumor plasticity at the origin of drug resistance [4].

To enhance therapeutic efficiency, several strategies of selective drug delivery targeting TME biomarkers, have emerged [5–8]. The high prevalence of hypoxic regions in the resistance of tumors to therapies has led to the emergence of hypoxia-activated prodrugs (HAPs), i.e. drugs designed to release the cytotoxic drug in hypoxic areas only. Molecular mechanisms of the different HAP classes have in common mono or di-electronic reduction activation by endogenous oxidoreductases in hypoxic cells, whose expressions was demonstrated to be correlated to hypoxia levels in tumors [9–11]. Many preclinical studies identified TH-302 (Evoxofamide) as one of the most promising HAP of isophosphoramidate nitrogen mustard class for antitumor activity. This HAP can be used either in monotherapy or in combination with conventional chemotherapy and radiotherapy [5-13]. The success of these preclinical studies has led to clinical studies ongoing in phase 3 [5]. Studies showed that imaging methods sensitive to tumor hypoxia were able to predict the efficiency of TH-302 therapy. Hypoxia PET tracers, including [¹⁸F]FAZA[14], [¹⁸F]-HX4 [17,18], and [¹⁸F]FMISO [16,19] were predictive of a tumor's response to TH-302. MRI contrasts like DCE [20], IVIM-DWI or BOLD were also used to monitor the tumor microenvironment changes associated to the therapy.

Chondrosarcomas constitute a highly heterogeneous group accounting for about 20% of bone sarcomas. Current treatments present a limited efficiency [21–25] leading to surgery as main solution. However, unresectable locations as well as recurrence after curettage are still an issue [26–29]. Even immune checkpoint inhibitors, which have shown promising results in multiple solid cancer types, have limited efficiency in chondrosarcomas [30,31]. Reasons for chondrosarcoma resistance to chemotherapy has been largely attributed to its TME characterized by heterogeneous hyaline-dense extracellular matrix, low pH, increased interstitial pressure and poor vascularity associated to hypoxia [22–26,32]. To reach an efficient treatment, the use of a drug targeting the hypoxia regions, i.e. based on HAP, might be an interesting solution. To the best of our knowledge, among the numerous preclinical studies which have

assessed the therapeutic effect of TH-302 [33], none of them were focused on chondrosarcoma. Our group was the only one to highlight the relevance of TH-302 *in vitro* in multicellular tumor spheroid of human extraskeletal myxoid chondrosarcoma suggesting its relevance To treat this pathology [34].

In this paper, we decided to evaluate *in vivo* in a preclinical model of chondrosarcoma the antitumor activity of TH-302 thanks to multimodal imaging. The extensively characterized grade II orthotopic preclinical Swarm rat chondrosarcoma (SRC) model was used [35–37]. To evaluate its translational relevance, we monitored phenotypic and functional remodeling of the TME by combining nuclear imaging and MRI. Nuclear medicine was focused on tumoral glucose metabolism ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$), hypoxia ($[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$) and extracellular matrix proteoglycans by exploiting the proteoglycan $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NTP 15-5}$ tracer[38]. Multiparametric MRI (T_2 , ADC) and CEST MRI (gag and APT / Guanidyl CEST ratio contrasts) allowed longitudinal monitoring of tumoral size, molecular interactions, proteoglycan quantity and extracellular pH, respectively. At the end of protocol, histological and immunohistochemistry analyses of tumor tissues (HES, Ki-67, GLUT1, $\gamma\text{-H2AX}$, Pimonidazole, Alcian Blue) as well as biochemical assay of sulfated glycosaminoglycans were performed.

METHODS

Overview of the study design

An overview of the study design is available in **Figure 1**.

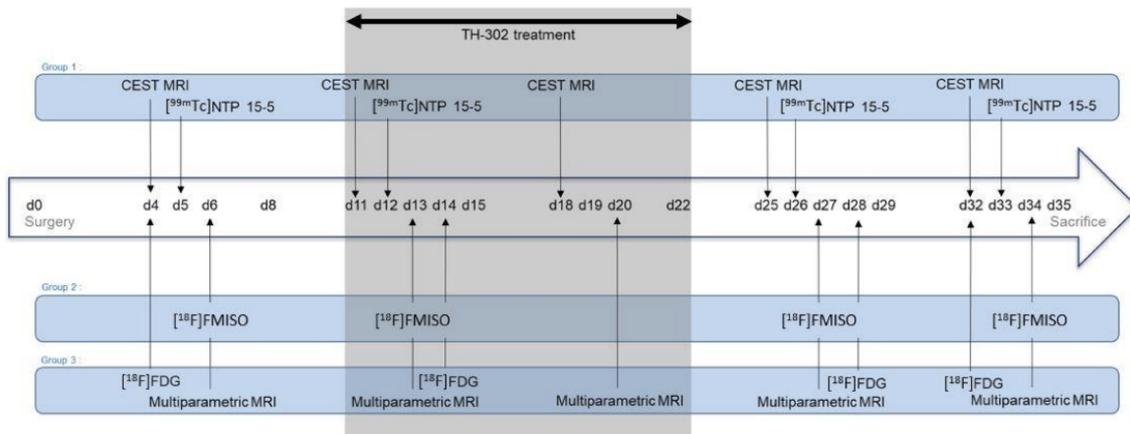


Figure 1. Study Design. Animals were randomized in 3 groups for imaging. Group 1 was assigned to CEST MRI and $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NTP 15-5}$ nuclear imaging (n=4 controls and n=4 treated). Group 2 was assigned to $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ nuclear imaging (n=3 controls and n=3 treated). Group 3 was assigned to $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ PET imaging and multiparametric MRI (n=3 controls and n=3 treated). TH-302 treatment was performed from d+11 to d+22.

Swarm rat chondrosarcoma model

Experiments were conducted in accordance with the European directive 2010/63/EU after approval by the animal ethical committee C2E2A, protocol #20398.

For reactivation, SRC fragments were defrosted in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco Laboratories, Gaithersburg, MD, US), then rigorously selected and manually calibrated to 3 mm³. These fragments were implanted on the right posterior tibia of male Sprague Dawley OFA rats (n = 10; 193.3 g ± 12.6 g) (Charles River Laboratories France, Saint Germain Nuelles, FR) after periosteal abrasion. Isoflurane (inhalation, 2.5%, 1 L/min, air/O₂, 70/30, v/v; ISO-VET, Piramal Critical Care Limited, West Drayton, UK) and carprofen (subcutaneous injection, 4 mg/kg; Rimadyl®, Pfizer, New-York, NY, US) were used for anesthesia and pain management protocols, respectively. After 31 days post-surgery, tumors were resected and immediately placed in cold DMEM, then reactivated SRC fragments of 3mm³ were transplanted, in the same way as previously described [39], on the right posterior tibia of male Sprague Dawley OFA rats (n = 35; 200.8 g ± 9.4 g).

TH-302 treatment and tolerance

TH-302 was bought from MedChemTronica (Solentuna, SE) and dissolved in NaCl/EtOH, 95/5, v/v. Animals were randomly divided into control (vehicle; n = 21) and TH-302 (50 mg/kg; n = 14) treated groups. Treatment was administered by IP injection 5 days a week from 11 to 22 days post-transplant. Rats were daily weighted and bodyweight changes (BWC) were calculated as:

$$BWC = \frac{BW_{end} - BW_{day1}}{BW_{day1}} \times 100$$

With BW_{day1} and BW_{end} the animal body weight the first and last day of the treatment, respectively. Tumor growth was monitored twice a week and tumor diameters (TD) were measured by digital caliper. The tumor volume (TV) was calculated:

$$TV = \frac{TD_{longest} * TD_{shortest}^2}{2}$$

Once a week, tumor volumes were also determined on anatomical MRI images by hand-drawn tumor ROIs using Bspline tool on free MIPAV software (v11.0.3; National Institutes of Health, Bethesda, MD, US) [40]. At the end of follow-up, 35 days post-transplant, rats were sacrificed and tumor and muscle were harvested for *ex vivo* analyses.

***In vivo* imaging**

All imaging experiments were performed at “*In Vivo* Imaging Auvergne” (IVIA) facility (<https://doi.org/10.18145/ivia>). During these *in vivo* acquisitions, all animals were anesthetized by isoflurane (inhalation, 2%, 1 L/min, air/O₂, 70/30, V/V; ISO-VET, Piramal Critical Care Limited, West Drayton, UK). All animals were secured on a dedicated bed with both breathing rate and body temperature being monitored during acquisitions.

Nuclear imaging

[^{99m}Tc]NTP 15-5 planar imaging

Planar scintigraphic images were acquired using a camera (NanoScan®, Mediso Ltd, Budapest, HU) equipped with one low energy ultra-high resolution (LEUHR) collimator. Planar acquisitions were performed with a 20% window centered on the 140 keV photopeak of [^{99m}Tc], 30 min after [^{99m}Tc]NTP 15-5 iv injection (30 Mbq/animal; n = 8) by using NuLine software (v3.00.018, Mediso Ltd, Budapest, HU). The acquisition time lasted 20 min. Each animal was submitted to 4 serial [^{99m}Tc]NTP 15-5 imaging during this longitudinal protocol. Analyses were performed with Interview™FUSION (v3.03.074, Mediso Ltd) software using a 2D elliptical ROI delineated over tumoral uptake and a manually drawn ROI over muscle of the contralateral paw. ROI sum total activities were obtained in counts/s and normalized to both the ROI area and the injected activity. Then, tumor to muscle ratios were calculated.

[¹⁸F]FDG and [¹⁸F]FMISO PET imaging

PET images were acquired using a small animal device (eXplore Vista®, GE Healthcare, Chicago, IL, US). Rats (n = 6) were anesthetized and 30 MBq of [¹⁸F]FDG or 50 MBq of [¹⁸F]FMISO were iv injected to study tumor glucose metabolism or hypoxia fraction, respectively. The PET imaging was performed 1h (animals kept asleep) or 4h (animals awake) after the [¹⁸F]FDG and [¹⁸F]FMISO, respectively by using MMWKS® Image software (GE Healthcare). Imaging parameters for both radiotracers were a 250 to 700 keV energy window and 6 ns coincidence time window (20 min duration, 2 bed positions). Each animal was imaged at 4 different times. After 2D OSEM reconstructions, analyses were performed with VivoQuant™ software (v4.0 patch1, inviCRO, Boston, MA, US) using a VOI manually drawn for tumor and the muscles. VOI sum total activities were obtained in counts/s then were normalized to both the VOI area and the injected activity. Results were expressed as tumor to muscle ratios.

MRI

MR images of rats were acquired on an 11.7 Tesla Bruker BioSpec system (Bruker BioSpin, Ettlingen, DE) piloted by Paravision 6.0.1 software. Each animal was submitted to either 5 or 4 imaging sessions for T_2 /ADC or CEST protocols, respectively. A 72 mm circular polarizer volume coil was used for RF transmission and a surface array coil (2x2) positioned on both paws received the NMR signal (Bruker BioSpin). A T_2 -weighted image was used to localize the tumor.

DW and T_2 imaging

Tumor ADC maps were performed with a DWI sequence ($b_1=0$ s.mm⁻², $b_2=500$ s.mm⁻², $b_3=1000$ s.mm⁻², direction [0,0,1]) with a TE of 25 ms and a TR of 2000 ms. The FOV was 50 mm with an axial slice thickness of 1 mm leading to a nominal resolution of $0.33 \times 0.33 \times 1$ mm³. T_2 mapping was performed by a spin-echo RARE sequence with effective TEs of 6.5; 19.5; 32.5; 45.5; 58.5 ms, TR 5500 ms and a RARE acceleration factor of 2. The FOV was 50 mm with an axial slice thickness of 1 mm leading to a nominal resolution of $0.78 \times 0.78 \times 1$ mm³. The number of slices was adjusted to image the whole tumor. ADC values were calculated by the image display and processing tool of Paravision 6.0.1 with a hand-drawn ROI on the tumor.

CEST imaging

CEST acquisitions were based on a RARE sequence with an effective TE and TR of 4.756 and 4500 ms, respectively and a RARE acceleration factor of 16. The slice thickness was 1 mm and the FOV 50 mm, i.e. the in-plane voxel size was 0.78×0.78 mm². Each image was recorded from a single transient. A first z-spectrum was recorded to correct for \mathbf{B}_0 inhomogeneities by using the WASSR approach [41] (saturation pulses B_1 0.3 μ T, 54.8 ms gaussian pulses repeated 18 times with an interpulse delay of a 0.010 ms, and a bandwidth of 50 Hz leading to a saturation train of 1 s; saturation offsets from ± 1000 Hz with $\Delta\omega$ 50 Hz) followed by the CEST z-spectrum (30 min acquisition duration with saturation pulses: B_1 1.5 μ T, 54.8 ms gaussian pulses repeated 72 times with a bandwidth of 50 Hz leading to a saturation train of 4 s and an equivalent continuous wave CEST saturation of 0.6 μ T; saturation offsets from ± 2500 Hz with $\Delta\omega$ 50 Hz).

CEST MRI data were analyzed with an in-house program written in MATLAB® R2017a (MathWorks, Natick, MA, US). In brief, a ROI was manually drawn on the T_2 -weighted image to delineate the tumor and muscle on contralateral paw. Then, \mathbf{B}_0 shift was corrected voxel-by-voxel with the WASSR approach. Finally, the CEST methodology applied to analyze the data depended on the saturation offset. For gagCEST, the z-spectrum was fitted with two Lorentzian shapes per voxel in each ROI: the first one to estimate the signal attenuation due to the water direct saturation (centered at 0 ppm) and the second one for the hydroxyl moieties. The gagCEST signal intensity corresponded to the area of this latter Lorentzian

shape. Regarding guanidyl and APT CEST, we applied the three-offset measurement approach proposed by Jin et al. [42] to avoid nuclear overhauser enhancement (NOE) interferences. In practice, two limits were chosen (1.60 to 2.40 and 3.20 to 4.00 ppm for the guanidyl and amide moieties, respectively) and a baseline was drawn between these frequencies. The CEST effect for APT* and guanidyl* were quantified as the difference between the baseline and the water signal at 1.96 and 3.68 ppm, respectively. The ratio of APT* to guanidyl* was then calculated voxel-by-voxel in tumor ROI and a mean value was determined. To evaluate tumor heterogeneity, the voxels were merged in function of their CEST values and the number of voxels contained in each bin was represented (as percentage of the total voxel number). To set the intensity intervals, i.e. widths of the bins, we used the Freedman-Diaconis rule and the widest bin was chosen between the two groups (treated vs control) for a same day. Voxel number was normalized to the tumor ROI area and weighted sum of voxel was calculated for each group and each time before being transformed in percentage.

Histology

At the end of imaging session, 35 days post-transplant, rats were sacrificed by progressive CO₂ inhalation within euthanasia chamber. Tumors and contralateral anterior muscles of the contralateral paw were resected and cut into two samples. The first part was fixed into 10% neutral buffered formalin for 24 h and embedded in paraffin for histological analysis (alcian blue or pimonidazole staining). The second part was frozen in liquid nitrogen for biochemical assays. Histological, immunofluorescence and immunohistochemistry experiments were performed at the histopathology facility ANIPATH (CNRS UMR 6293 / Inserm U1103 GReD, Clermont-Ferrand, FR) and were recorded using a slide scanner (X20, Zeiss AxioScan Z1, ZEN software, Oberkochen, DE). After staining detection and image recording, tumor slices were analyzed on free QuPath software [43] (v0.3.0) with positive cell detection protocol. For each slices, three rectangular ROI were placed at the periphery of different tumor lobules as illustrated in supplementary Figure 1.

Alcian blue and Hematoxylin Eosin staining

5 µm thick sections of embedded tumors were cut and adhered to poly-L-Lysine-coated microscope slides. After dewaxing and rehydration, slides were stained by Alcian blue (pH 1, 1% m/V, #A5268; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, US) to visualize PGs, counterstained by nuclear red or by hematoxylin-eosin.

γ-H2AX and GLUT1 immunohistochemistry

5 µm thick sections of embedded tumors were cut and adhered to poly-L-Lysine-coated microscope slides. After dewaxing and rehydration of tumor slices, antigens were retrieved (boiling citrate buffer

solution: 10 mM, pH 6). Endogenous peroxidases were quenched (H_2O_2 : 0.3%, 30 min) and saturated (BSA: 1%, 1 h, Avidin/Biotin blocking kit #SP-2001; Vector Laboratories, Burlingame, CA, US). Slides were then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies (anti-phospho-histone H2A.X antibody #05-63, 1/500; Merck-Millipore, Burlington, MA, US and anti-glucose transporter GLUT1 antibody #ab652, 1/100; Abcam, Cambridge, UK). Biotinylated secondary antibody (1/500, BSA 0.1%, 1 h, RT; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, US) was used to reveal the first antibody. Biotin was then complexed with streptavidin-coupled horseradish peroxidase (HRP) (Vectastain® ABC-HRP kit Peroxidase #PK-4000; Vector laboratories). Peroxidase was detected using diaminobenzidin (DAB) as per manufacturer's instructions (ImmPACT® DAB substrate #SK-4105; Vector laboratories). Then, nuclei were counterstained with hematoxylin and coverslips were fixed.

Ki-67 and Pimonidazole immunofluorescence

For pimonidazole staining, an IP injection of pimonidazole hydrochloride (60 mg/kg, Hypoxyprobe™, Burlington, MA, US) was performed one hour before sacrificing of the animals.

5 µm thick sections of embedded tumors were cut and adhered to poly-L-Lysine-coated microscope slides. After dewaxing and rehydration of tumor slices, antigens were retrieved (boiling citrate buffer solution: 10 mM, pH 6) and slides were placed into the InsituPro VSi robot (Intavis bioanalytical instruments, Köln, DE). Endogenous peroxidases were quenched (H_2O_2 : 0.3%, 30 min) and saturated (BSA: 1%, 1 h). Slides were then incubated 1h at RT with primary antibodies (anti-Ki67 rabbit monoclonal antibody #15580, 1/2000; Abcam and anti-pimonidazole mouse monoclonal antibody # HP MAb-1, 1/300; Hypoxyprobe, Burlington, MA, US). Biotinylated secondary antibody (1/500, BSA 0.1%, 1 h; Vector Laboratories) was used to reveal the first antibody. Biotin was then complexed with streptavidin-coupled horseradish peroxidase (HRP) (1/500, 30 min; Vector Laboratories). Peroxidase was detected using tyramide signal amplification (TSA) as per manufacturer's instructions (Alexa Fluor™ 488; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US). Then, nuclei were counterstained with Hoechst 33342 and coverslips were fixed. Emitted fluorescences (461 nm for Hoechst and 519 nm for TSA) were imaged and recorded.

Biochemical assay

Samples of tumors and muscles were weighed (20-50 mg), incubated overnight at 65 °C in 1 mL of a papain extraction buffer, and then centrifuged (1000 g, 10 min). sGAG content was determined using the dimethyl methylene blue method (Blyscan® Sulfated Glycosaminoglycan assay kit; Biocolor Ltd, Carrickfergus, UK) as per manufacturer's instructions. Absorbance was measured at 656 nm using Thermo Scientific Multiskan GO device (Thermo Fisher Scientific). Experiments were performed in duplicates.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed on Prism software version 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, US). Data normal distributions were verified with Shapiro-Wilk tests before performing parametric tests. For tumor volume assessment, *in vivo* nuclear imaging and MRI quantifications, multiple unpaired parametric t-tests were applied. To evaluate CEST voxel distribution, Wilcoxon-Mann-Whitney tests were used. For histological analyses, unpaired parametric t-tests or Mann-Whitney test were performed, depending on data distribution. Multiple unpaired nonparametric t-tests were applied for biochemical assay. Results were considered significant at p values <0.05 (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001). Data are presented as mean value ± SD.

RESULTS

TH-302 has an antitumor activity in SRC model

Figure 2A illustrates the tumor growth on both control and treated animal groups. Both digital caliper and anatomical MRI measurements (Figures 2 B-C) showed a significant inhibition of tumoral growth from 19 days (p=0.0084) and 26 days post-transplant (p<0.0001), respectively. Comparison of TV between treated and controls at day 33 for caliper and day 35 for MRI measurements resulted in a comparable reduction of the TV by -75.66% and -74.26% respectively. BWCs were -23.1% ± 7.4% and +16.0% ± 2.1% for treated and control groups, respectively (Figure 2D).

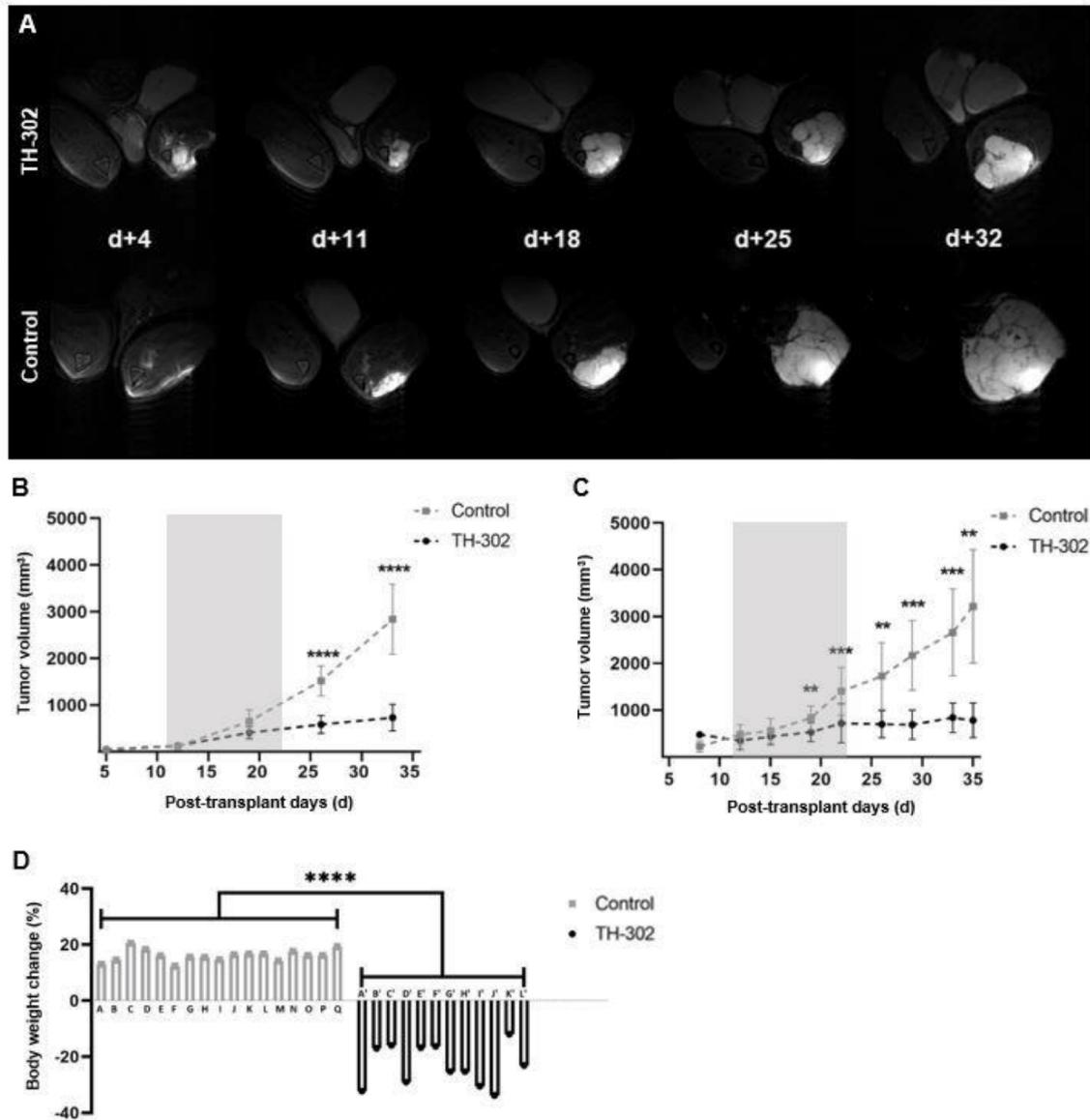


Figure 2. Antitumor efficiency of TH-302 and tolerance. (A) Axial T_2 -weighted images to highlight the tumor; TH-302 treated animal (top) and control animal (bottom). Tumor volume evolution measured by anatomical MRI **(B)** and digital caliper **(C)**. Treatment duration is represented as a grey block. **(D)** Percentage of bodyweight change at the last day of the study.

Antitumor efficiency was confirmed by histologic examination, as illustrated on Figure 3 for representative animals. HES staining (Figure 3A) clearly evidenced a decreased cellularity with 568 ± 126 positive nuclei per mm^2 in TH-302 group compare to 806 ± 141 for the control group ($p < 0.01$) (Figure 3B). Ki-67 staining, a marker of cell proliferation, was significantly decreased in treated tumors with a value of 8 ± 4 positive cells per mm^2 in regards of 53 ± 29 for control animals ($p = 0.0221$). (Figure 3D). Moreover, we observed that Ki67 positive cells in control group were mainly located in the outer periphery of tumor lobules (Figure 3C).

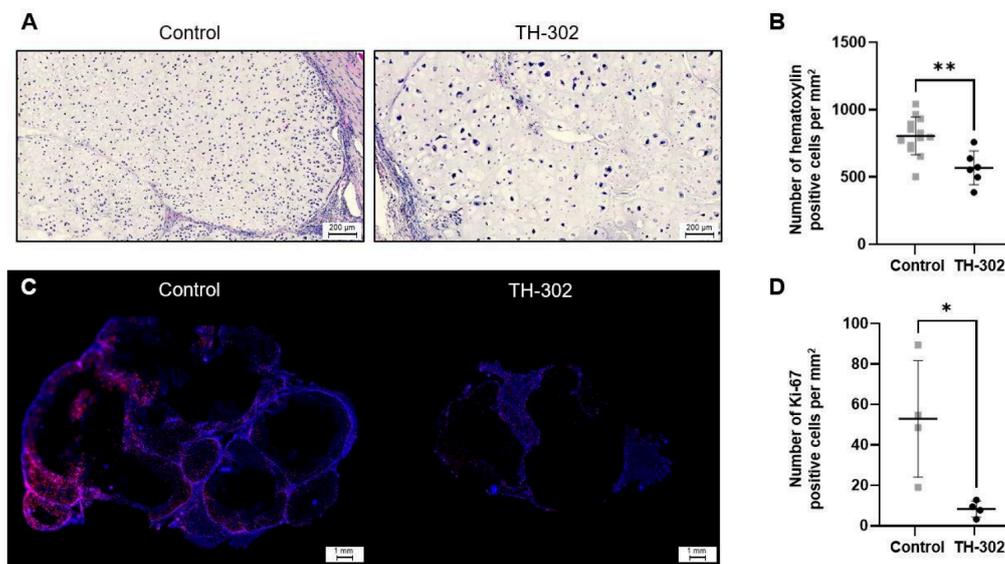


Figure 3. Ex vivo characterization of TH-302 antitumor activity. (A) Representative images of hematoxylin and eosin staining. (B) Quantification of hematoxylin positive cells. (C) Representative images of Ki-67 and (D) quantification of positive cells.

Expression of γ -H2AX was significantly increased ($p < 0.01$) in treated tumors when compared to control ones (Figure 4B), with positive cells being preferentially localized within hypoxic regions (Figure 4A). The pimonidazole staining accumulated in hypoxic cells was preferentially located at the inner periphery, below Ki-67 staining, in control tumor lobules (Figure 4C). In treated tumor, spotted staining with a weak fluorescence was observed. Fluorescence quantification (Figure 4D) showed significantly less positive cells per mm^2 in treated than in control groups (65 ± 24 vs 430 ± 122 ; $p = 0.0011$).

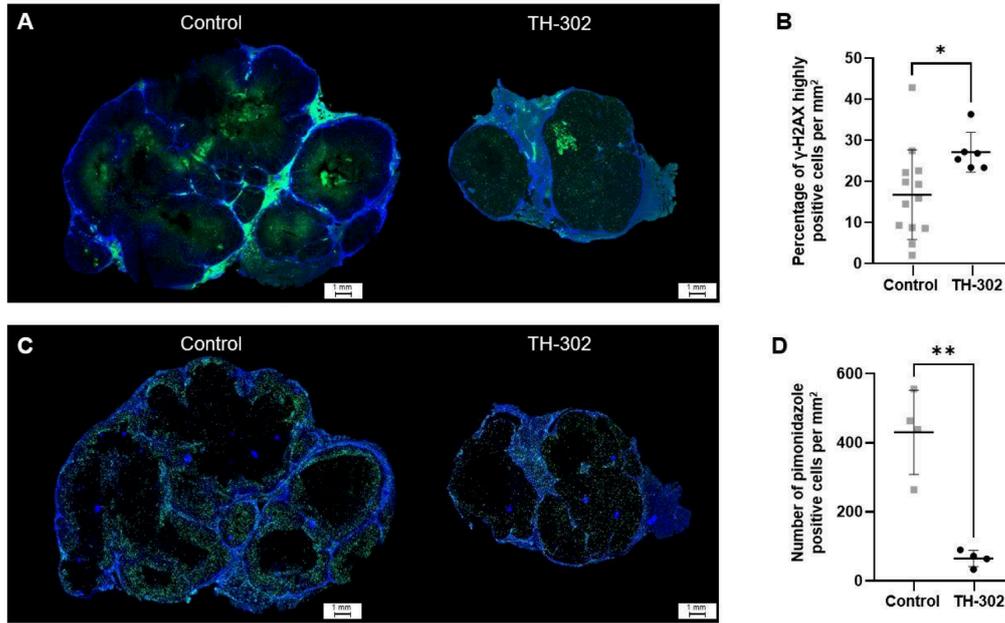


Figure 4. TH-302 induces DNA damages in hypoxic regions. (A) Representative images of γ -H2AX staining followed in (B) by the quantification of highly positive cells. (C) Representative images of pimonidazole staining (D) and its quantification

TH-302 induces changes of water mobility

During the longitudinal study, relative ADC evolution of tumoral tissue was observed to be significantly decreased ($p < 0.05$) in treated group compared to the control one from day 13 (Figure 5B). Regarding the T_2 relaxation time, it was constant for the treated group while it increased for the control one leading to a significant difference between both groups from day 19 ($p < 0.01$) (Figure 5A).

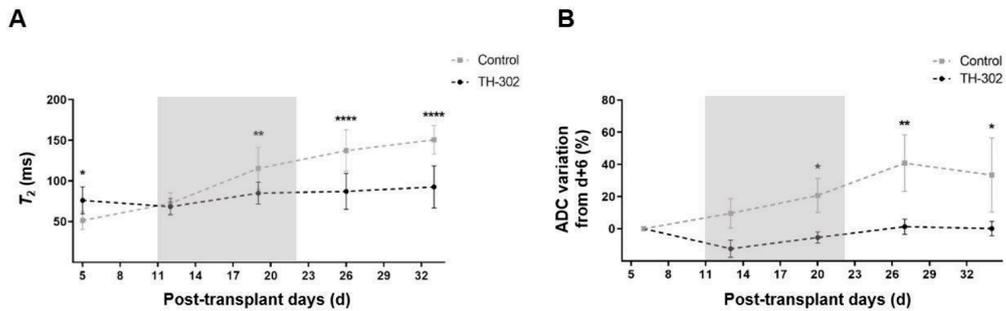


Figure 5. SRC microstructure evolutions during TH-302 therapy. (A) T_2 relaxation time and (B) relative ADC value evolution in the tumor. Treatment duration is represented as a grey block.

TH-302 reduces tumor glucose metabolism

As illustrated on Figure 6A, tumor accumulation of [¹⁸F]FDG appeared homogeneously distributed within tumoral tissue at early stages and for both TH-302 and control groups. For later stages of the protocol (from day 28), [¹⁸F]FDG accumulated in control animals at the periphery of the tumor. Interestingly, this was not observed for TH-302 treated animals. The T/M ratio 1.94 ± 0.04 and 2.51 ± 0.03 for treated and control groups, respectively leading to a significant difference ($p=0.0005$). This was confirmed also by GLUT1 immunohistochemistry as illustrated on Figures 6C and 6D. GLUT1 positive cells were significantly decreased in treated tumors (633 ± 136 vs 1151 ± 292 positive cells per mm^2 for treated and control groups, respectively; $p=0.0008$).

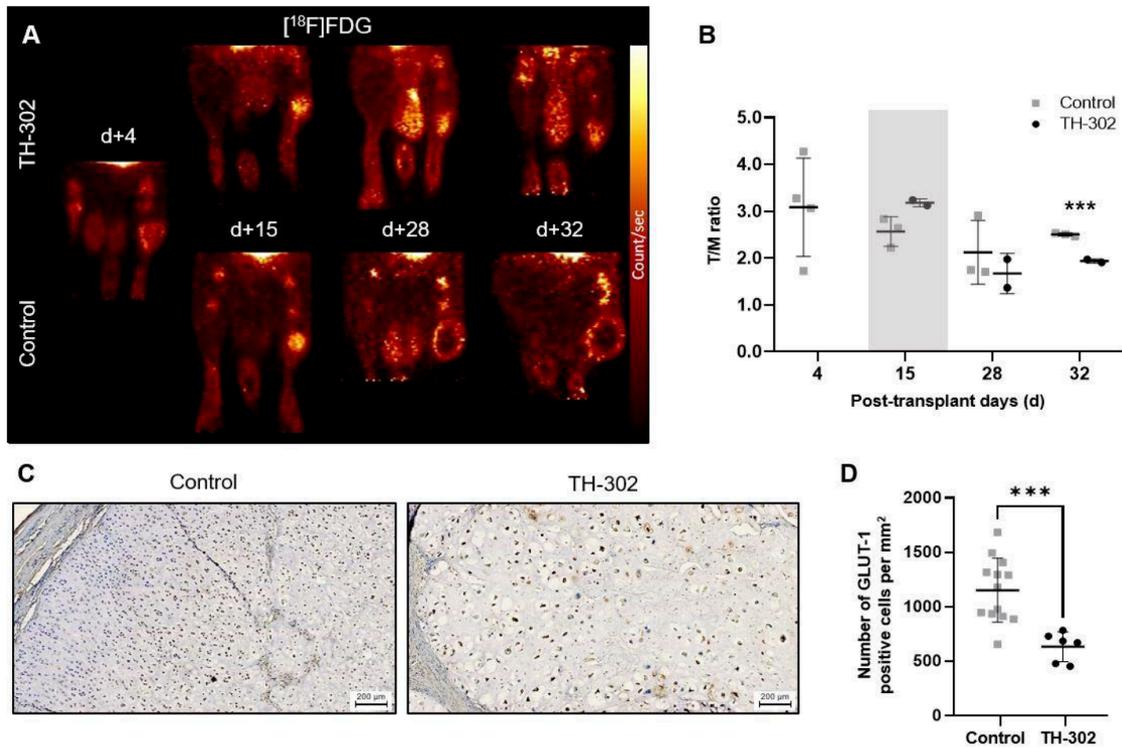


Figure 6. Glucose metabolism assessment during TH-302 treatment. (A) [¹⁸F]FDG coronal images and **(B)** quantification of radiotracer adsorption. **(C)** Representative images of GLUT1 staining. **(D)** GLUT1 positive cells.

TH-302 reduces hypoxic fraction

Figure 7A shows for representative animals, the accumulation of the [¹⁸F]FMISO tracer. At a late stage of the pathology (from day 27), the tumor was readily observed in the control animal whereas this was not the case for the treated animal. Quantitative analysis highlighted a lower T/M ratio for treated animals compare to the control ones at a late stage of the study, but with no statistical significance (Figure 7B).

Figure 7C illustrates the APT / Guanidyl CEST ratio for two representative animals. A strong spatial tumor heterogeneity was observed, more especially for controls that evidenced higher voxels with negative ratio respectively to treated. However, mean APT / Guanidyl CEST ratio within the tumor ROI did not show any significant difference between both groups (Figure 7D). To consider the tumor spatial heterogeneity, all voxel intensities were grouped by class intervals for each time point and then analyzed as a distribution (Figure 7E and supplementary Figure 2). Voxel intensities in treated tumors were significantly higher than controls for the last time point (p=0.0304).

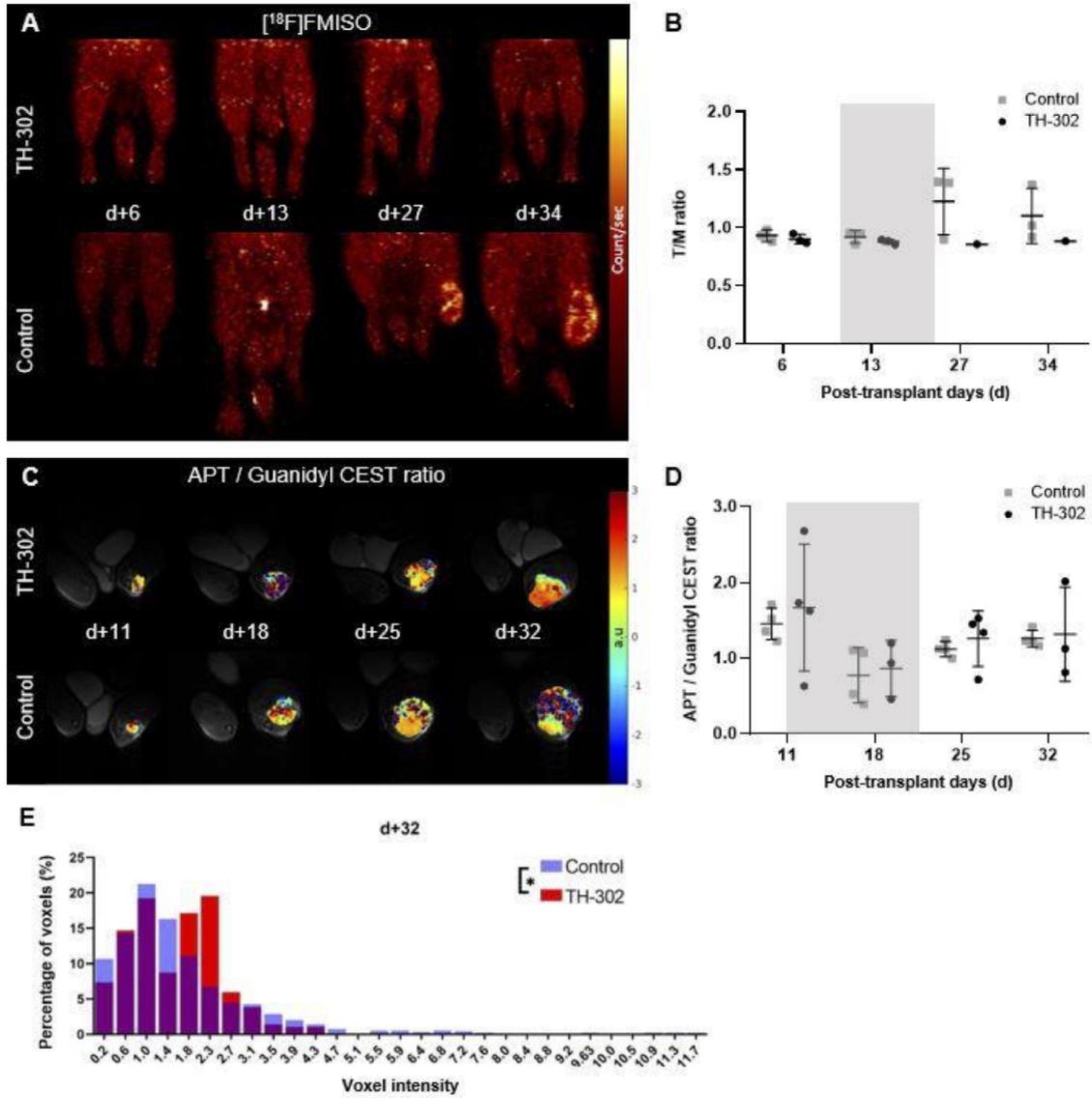


Figure 7. Hypoxic status and pH assessment with TH-302 treatment. (A) [^{18}F]FMISO coronal images and **(B)** quantification of its caption in the tumor. **(C)** Axial APT to Guanidyl CEST ratio images and **(D)** quantification at the ROI level. **(E)** APT to Guanidyl CEST ratio voxel intensity distribution. Treatment duration is represented as a grey block.

TH-302 induces proteoglycan remodeling

[^{99m}Tc]NTP 15-5 accumulation was observed in joints and in chondrosarcoma as early as day 5 (Figure 8A). As pathology evolved, both groups displayed an increase of radiotracer accumulation in tumors. Nevertheless, increase of radiotracer accumulation in tumor was significantly higher in TH-302 animals as compared to controls from day 26 ($p=0.0341$) (Figure 8B).

gagCEST imaging is displayed on Figure 8C for a representative treated and control animal. As pathology evolved, gagCEST signal increased in both groups, as evidenced by increasing AUC values (Figure 8D) but without any significant difference between treated and controls. This was also confirmed by voxel intensity distribution analysis (Figure 8E and supplementary Figure 3).

The blue alcian coloration (Figure 8F) shows that tumor from both groups contained a significant amount of sGAGs with a cellular structure which was not comparable. Biochemical sGAG assay was achieved to quantify sGAGs in tumoral tissues at the final time point. Treated tumors contained significantly more sGAGs than control tumor ECMs (68.5 ± 9.5 vs 92.0 ± 14.6 ($p=0.00075$)) while sGAG quantity in muscle for both groups were equivalent (1.8 ± 0.2 vs 1.9 ± 1.0 for control and treated groups, respectively) (Figure 8G).

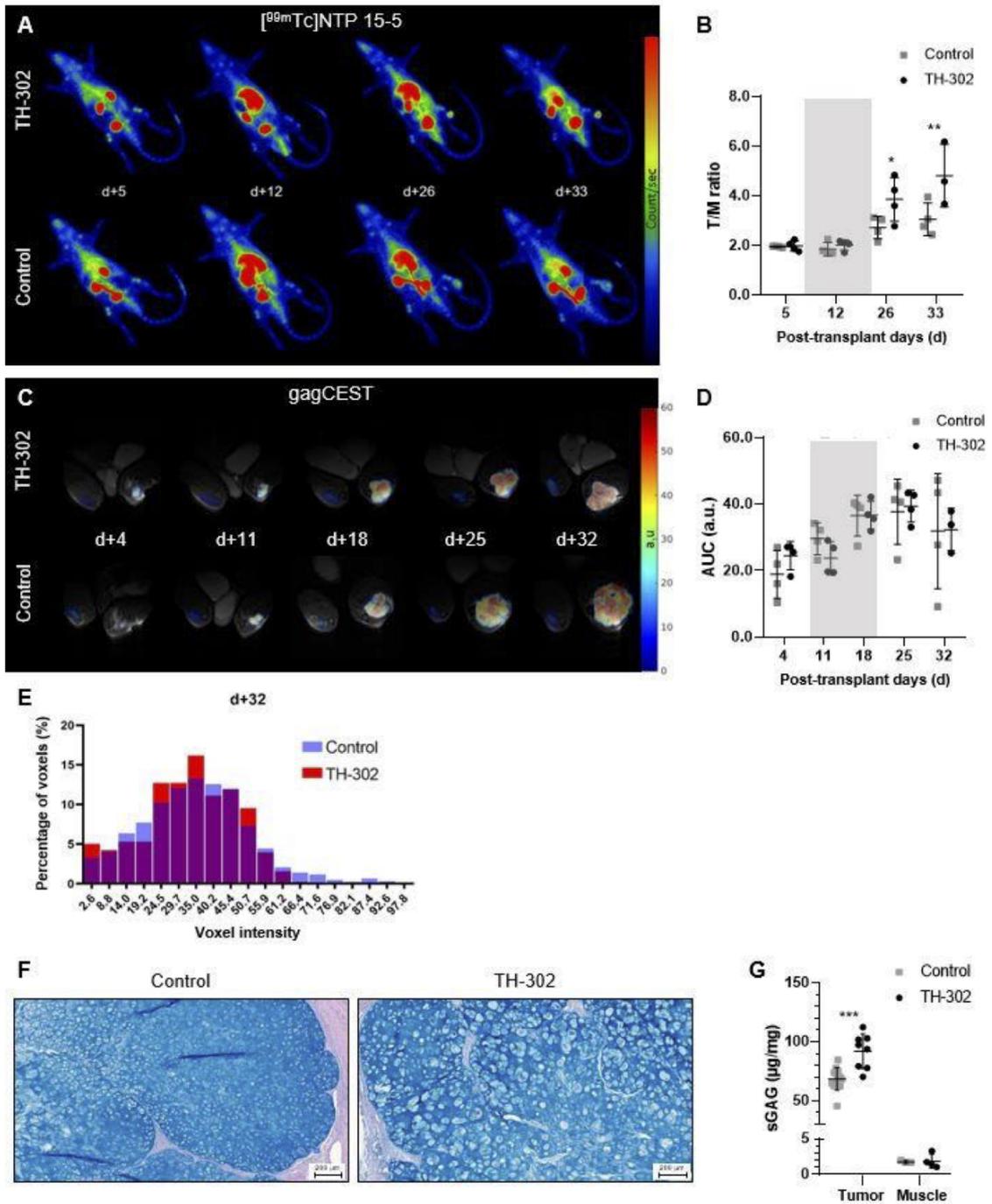


Figure 8. ECM changes under TH-302 treatment. (A) $[^{99m}\text{Tc}]$ NTP 15-5 planar images and **(B)** signal quantification inside the ROI. **(C)** Axial gagCEST images followed by **(D)** it quantification. **(E)** gagCEST voxel intensity distribution. **(F)** Representative images of alcian blue staining. **(G)** *Ex vivo* sGAG assay.

DISCUSSION

Both the poor prognostic and the lack of an efficient treatment of chondrosarcoma highlight the need of new therapeutic approaches. Tumor hypoxia as well as a high chondrogenic matrix were identified as the two factors driving its resistance to treatments. As some drugs are developed to specifically target one or several of the ECM properties, it appears interesting to treat chondrosarcoma animal model with one prodrug. Currently, TH-302 is the most promising HAP already tested in a wide range of hypoxic cancers [44], this is why this HAP was selected.

The paratibial SRC model used in this study was a grade II CHS since its aggressiveness and chemoresistance status mimics its human counterpart [45]. TH-302 therapy on SRC model results in an inhibition of tumoral growth for the treated group that can be observed from a week after the beginning of the treatment. Treatment efficiency was confirmed by histology with a decrease by a factor of 1.5 in cell density and by a factor higher than 6 for in cell proliferation as determined with Ki-67 positive cells quantitation. Tumoral metabolic activity, as evidenced by [¹⁸F]FDG PET imaging, was reduced in treated animals for the two last imaging sessions. *Ex vivo* imaging showed that glucose transporter 1 (GLUT1) was strongly affected by treatment. This transporter highlights both glucose metabolism and hypoxia. Interestingly, GLUT1 transporters were homogeneously distributed within tumoral tissue in treated group whereas in control one, they were preferentially located in the inner periphery of tumor lobules [46,47]. This observation, correlated with the reduction of the hypoxia in treated tumors (from pimonidazole staining), argued in favor of a reduced tumor redox status and potentially re-oxygenation of tissue during TH-302 therapy. Such conclusion was recently made in Mia-PACA-2 pancreatic xenograft models [46]. This hypothesis is supported *in vivo* by [¹⁸F]FMISO imaging that showed a more important hypoxic statue in control animals. Interestingly, DNA damage measured by γ -H2AX were not only present in hypoxic regions but also were observed to propagate to the whole tumoral tissue. All together, these results demonstrate that TH-302 treatment reduced intratumoral hypoxia in SRC model and are in agreement with previous study on nasopharyngeal carcinoma *in vivo* [48].

In this SRC model, the inhibition of tumoral growth was associated with changes in TME biomarkers, e.g. PG contain. [38] T_2 relaxation time and ADC are highly related to the interactions of water molecules with their surrounding environment and they could be affected by cellular structures, tissue density, interstitial fluid pressure as well as biomolecules conformation and changes. The increase of both T_2 and ADC in the control animals is most likely a sign of necrotic areas in the core of the tumor. This contrast with the absence of evolution of these parameters for the treated animals. From literature analysis, it may appear difficult to go further as results were described as being strongly dependent on individual tumor types, organs and therapies[49]. Literature also reports contradictory results on the effect of TH-302 therapy on ADC with an increase of ADC under TH-302 therapy in HCT116 colon xenografts and Hs766t pancreatic models [50]

whereas no ADC evolution was observed in SU.86.86 and Mia-Paca-2 xenografts [51]. Our results were similar to these latter models.

Both nuclear and MR imaging were applied to study hypoxia and proteoglycan evolution during the therapy. The information obtained from one method is complementary to the other one. Concerning the sGAG content, the [^{99m}Tc]NTP-15-5 imaging is sensitive to the negatively charged PG while the gagCEST images the whole different proteoglycans [52,53]. This is probably the reason for the discrepancy between both approaches. The explanation to support the imaging results is the following. The ECM remodeling due to the TH-302 treatment lead to an increase of negative charge accessibility but not to an evolution of sGAG concentration. This was also supported *ex vivo* by sGAG biochemical assay showing a significant increase of negatively charged sGAG. Further analysis by RNAseq could be performed to explore the impact of TH-302 on the expression of sGAGs constituting the extracellular matrix.

Concerning the tumor hypoxic status, no evolution occurred during this longitudinal study. However, by exploiting the excellent MRI resolution, the heterogeneity of the tumor can be characterized. Despite the fact that no difference was detected at the whole tumor level by CEST MRI, the voxel intensity repartition was significantly different for the last time point. To go further, 3D CEST MRI could be an interesting tool to evaluate the precise impact of TH-302 therapy on the whole tumor volume. Moreover, regarding our previous results showing that APT / Guanidyl CEST ratio decrease with a lower pH [54] we can presume that TH-302 therapy limits the tumor acidification.

One of the limitations of our work might be the low number of animals used. However, this study was ambitious and used many *in vivo* imaging approaches to obtain complementary information on the different CHS properties. Furthermore, to limit model variability we decided to induce the CHS to all the animals at the same time and then to proceed to the full longitudinal study in a single shot. During the study, few animals reached an ethical limit regarding either their tumor size or their weight loss and were sacrificed. Weight loss during TH-302 was previously described [33]. Despite these limitations, the differences between both groups were high enough allowing us to draw strong conclusions on the TH-302 therapy efficiency.

CONCLUSION

Our multimodal imaging strategy has allowed monitoring the impact of TH-302 on multiple aspects of CHS microenvironment. Multimodal imaging offers the possibility to assess structural/matrix, metabolic and hypoxic status perspective over time non-invasively. We demonstrated that this HAP drug targets the hypoxic cells in CHS leading to TH-302 monotherapy as an excellent candidate to be an efficient chemotherapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Christelle Damon-Soubeyrand (Anipath facility) for precious technical help with histological equipment.

Financial support

This research was supported by Ligue contre le cancer Auvergne-Rhône-Alpes (project number R224CC / allocation number: RAB20018CCA)

COMPETING INTERESTS

All authors declare that no competing interest exists.

REFERENCES

1. Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal*. 2020; 18: 59.
2. Yeldag G, Rice A, Del Río Hernández A. Chemoresistance and the Self-Maintaining Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2018; 10: E471.
3. Wu P, Gao W, Su M, et al. Adaptive Mechanisms of Tumor Therapy Resistance Driven by Tumor Microenvironment. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9: 641469.
4. Jing X, Yang F, Shao C, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol Cancer*. 2019; 18: 157.
5. Valkenburg KC, de Groot AE, Pienta KJ. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018; 15: 366–81.
6. Dzobo K. Taking a Full Snapshot of Cancer Biology: Deciphering the Tumor Microenvironment for Effective Cancer Therapy in the Oncology Clinic. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*. 2020; 24: 175–9.
7. Martin M, Wei H, Lu T. Targeting microenvironment in cancer therapeutics. *Oncotarget*. 2016; 7: 52575–83.
8. Tang T, Huang X, Zhang G, Hong Z, Bai X, Liang T. Advantages of targeting the tumor immune microenvironment over blocking immune checkpoint in cancer immunotherapy. *Sig Transduct Target Ther*. 2021; 6: 72.
9. Anduran E, Dubois LJ, Lambin P, Winum J-Y. Hypoxia-activated prodrug derivatives of anti-cancer drugs: a patent review 2006 - 2021. *Expert Opin Ther Pat*. 2022; 32: 1–12.
10. Su M-X, Zhang L-L, Huang Z-J, Shi J-J, Lu J-J. Investigational Hypoxia-Activated Prodrugs: Making Sense of Future Development. *Curr Drug Targets*. 2019; 20: 668–78.
11. Phillips RM. Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016; 77: 441–57.

12. Harms JK, Lee T-W, Wang T, et al. Impact of Tumour Hypoxia on Evofosfamide Sensitivity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patient-Derived Xenograft Models. *Cells*. 2019; 8: E717.
13. Jardim-Perassi BV, Mu W, Huang S, et al. Deep-learning and MR images to target hypoxic habitats with evofosfamide in preclinical models of sarcoma. *Theranostics*. 2021; 11: 5313–29.
14. Haynes J, McKee TD, Haller A, et al. Administration of Hypoxia-Activated Prodrug Evofosfamide after Conventional Adjuvant Therapy Enhances Therapeutic Outcome and Targets Cancer-Initiating Cells in Preclinical Models of Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2018; 24: 2116–27.
15. Van Cutsem E, Lenz H-J, Furuse J, et al. MAESTRO: A randomized, double-blind phase III study of evofosfamide (Evo) in combination with gemcitabine (Gem) in previously untreated patients (pts) with metastatic or locally advanced unresectable pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *JCO*. 2016; 34: 4007–4007.
16. Yoon J, Kang SY, Lee K-H, Cheon GJ, Oh D-Y. Targeting Hypoxia Using Evofosfamide and Companion Hypoxia Imaging of FMISO-PET in Advanced Biliary Tract Cancer. *Cancer Res Treat*. 2021; 53: 471–9.
17. Peeters SGJA, Zegers CML, Biemans R, et al. TH-302 in Combination with Radiotherapy Enhances the Therapeutic Outcome and Is Associated with Pretreatment [¹⁸F]HX4 Hypoxia PET Imaging. *Clin Cancer Res*. 2015; 21: 2984–92.
18. Larue RTHM, Van De Voorde L, Berbée M, et al. A phase 1 ‘window-of-opportunity’ trial testing evofosfamide (TH-302), a tumour-selective hypoxia-activated cytotoxic prodrug, with preoperative chemoradiotherapy in oesophageal adenocarcinoma patients. *BMC Cancer*. 2016; 16: 644.
19. Stokes AM, Hart CP, Quarles CC. Hypoxia Imaging With PET Correlates With Antitumor Activity of the Hypoxia-Activated Prodrug Evofosfamide (TH-302) in Rodent Glioma Models. *Tomography*. 2016; 2: 229–37.
20. Cárdenas-Rodríguez J, Li Y, Galons J-P, et al. Imaging biomarkers to monitor response to the hypoxia-activated prodrug TH-302 in the MiaPaCa2 flank xenograft model. *Magnetic Resonance Imaging*. 2012; 30: 1002–9.
21. Kubo T, Sugita T, Shimose S, Matsuo T, Arihiro K, Ochi M. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. *J Bone Joint Surg Br*. 2008; 90: 364–70.
22. Boeuf S, Bovée JVMG, Lehner B, Hogendoorn PCW, Richter W. Correlation of hypoxic signalling to histological grade and outcome in cartilage tumours. *Histopathology*. 2010; 56: 641–51.
23. Chen C, Zhou H, Wei F, et al. Increased levels of hypoxia-inducible factor-1 α are associated with Bcl-xL expression, tumor apoptosis, and clinical outcome in chondrosarcoma. *J Orthop Res*. 2011; 29: 143–51.
24. Kouvaras E, Christoni Z, Siasios I, Malizos K, Koukoulis GK, Ioannou M. Hypoxia-inducible factor 1-alpha and vascular endothelial growth factor in cartilage tumors. *Biotech Histochem*. 2019; 94: 283–9.
25. Kim H, Cho Y, Kim H-S, et al. A system-level approach identifies HIF-2 α as a critical regulator of chondrosarcoma progression. *Nat Commun*. 2020; 11: 5023.

26. Hameed M. Malignant Cartilage-Forming Tumors. *Surg Pathol Clin.* 2021; 14: 605–17.
27. Polychronidou G, Karavasilis V, Pollack SM, Huang PH, Lee A, Jones RL. Novel therapeutic approaches in chondrosarcoma. *Future Oncol.* 2017; 13: 637–48.
28. Rock A, Ali S, Chow WA. Systemic Therapy for Chondrosarcoma. *Curr Treat Options Oncol.* 2022; 23: 199–209.
29. Miwa S, Yamamoto N, Hayashi K, Takeuchi A, Igarashi K, Tsuchiya H. Therapeutic Targets and Emerging Treatments in Advanced Chondrosarcoma. *Int J Mol Sci.* 2022; 23: 1096.
30. Tawbi HA, Burgess M, Bolejack V, et al. Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017; 18: 1493–501.
31. Wagner MJ, Ricciotti RW, Mantilla J, Loggers ET, Pollack SM, Cranmer LD. Response to PD1 inhibition in conventional chondrosarcoma. *J Immunother Cancer.* 2018; 6: 94.
32. Nazeri E, Gouran Savadkoochi M, Majidzadeh-A K, Esmaili R. Chondrosarcoma: An overview of clinical behavior, molecular mechanisms mediated drug resistance and potential therapeutic targets. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018; 131: 102–9.
33. Sun JD, Liu Q, Ahluwalia D, et al. Efficacy and safety of the hypoxia-activated prodrug TH-302 in combination with gemcitabine and nab-paclitaxel in human tumor xenograft models of pancreatic cancer. *Cancer Biology & Therapy.* 2015; 16: 438–49.
34. Voissiere A, Jouberton E, Maubert E, et al. Development and characterization of a human three-dimensional chondrosarcoma culture for in vitro drug testing. *PLoS One.* 2017; 12: e0181340.
35. Simard FA, Richert I, Vandermoeten A, et al. Description of the immune microenvironment of chondrosarcoma and contribution to progression. *Oncoimmunology.* 2017; 6: e1265716.
36. Liao Y-X, Hua Y-Q, Cai Z-D. Current advances in animal model of chondrosarcoma and related research. *Biomed Rep.* 2013; 1: 3–6.
37. Hamm CA, Stevens JW, Xie H, et al. Microenvironment alters epigenetic and gene expression profiles in Swarm rat chondrosarcoma tumors. *BMC Cancer.* 2010; 10: 471.
38. Miot-Noirault E, David E, Vidal A, et al. ^{99m}Tc-NTP 15-5 assessment of the early therapeutic response of chondrosarcoma to zoledronic acid in the Swarm rat orthotopic model. *EJNMMI Res.* 2013; 3: 40.
39. Grimaud E, Damiens C, Rousselle AV, Passuti N, Heymann D, Gouin F. Bone remodelling and tumour grade modifications induced by interactions between bone and swarm rat chondrosarcoma. *Histol Histopathol.* 2002; 17: 1103–11.
40. McAuliffe MJ, Lalonde FM, McGarry D, Gandler W, Csaky K, Trus BL. Medical Image Processing, Analysis and Visualization in clinical research. In: *Proceedings 14th IEEE Symposium on Computer-Based Medical Systems CBMS 2001.* 2001.

41. Kim M, Gillen J, Landman BA, Zhou J, van Zijl PCM. Water saturation shift referencing (WASSR) for chemical exchange saturation transfer (CEST) experiments. *Magn Reson Med.* 2009; 61: 1441–50.
42. Jin T, Wang P, Zong X, Kim S-G. MR imaging of the Amide-Proton Transfer effect and the pH-insensitive Nuclear Overhauser Effect at 9.4 T. *Magn Reson Med.* 2013; 69: 760–70.
43. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 2017; 7: 16878.
44. Li Y, Zhao L, Li X-F. The Hypoxia-Activated Prodrug TH-302: Exploiting Hypoxia in Cancer Therapy. *Front Pharmacol.* 2021; 12: 636892.
45. Morcuende JA, Stevens JW, Scheetz TE, et al. Swarm Rat Chondrosarcoma Cells as an in vivo model: Lung Colonization and Effects of Tissue Environment on Tumor Growth. *Iowa Orthop J.* 2012; 32: 46–53.
46. Kishimoto S, Brender JR, Chandramouli GVR, et al. Hypoxia-Activated Prodrug Evofosfamide Treatment in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Xenografts Alters the Tumor Redox Status to Potentiate Radiotherapy. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2021; 35: 904–15.
47. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004; 4: 891–9.
48. Huang Y, Tian Y, Zhao Y, et al. Efficacy of the hypoxia-activated prodrug evofosfamide (TH-302) in nasopharyngeal carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Communications.* 2018; 38: 15.
49. Fukuda T, Wengler K, de Carvalho R, Boonsri P, Schweitzer ME. MRI biomarkers in osseous tumors. *Journal of Magnetic Resonance Imaging.* 2019; 50: 702–18.
50. Ma M, Liang J, Zhang D, et al. Monitoring Treatment Efficacy of Antiangiogenic Therapy Combined With Hypoxia-Activated Prodrugs Online Using Functional MRI. *Front Oncol.* 2021; 11: 672047.
51. Zhang X, Wojtkowiak JW, Martinez GV, et al. MR Imaging Biomarkers to Monitor Early Response to Hypoxia-Activated Prodrug TH-302 in Pancreatic Cancer Xenografts. *PLOS ONE.* 2016; 11: e0155289.
52. Miot-Noirault E, Vidal A, Auzeloux P, Peyrode C, Madelmont J-C, Chezal J-M. In vivo scintigraphic imaging of proteoglycans. *Methods Mol Biol.* 2012; 836: 183–98.
53. Schmitt B, Zbýň Š, Stelzeneder D, et al. Cartilage Quality Assessment by Using Glycosaminoglycan Chemical Exchange Saturation Transfer and ²³Na MR Imaging at 7 T. *Radiology.* 2011; 260: 257–64.
54. Autissier R, Mazuel L, Maubert E, et al. Simultaneous proteoglycans and hypoxia mapping of chondrosarcoma environment by frequency selective CEST MRI. *Magn Reson Med.* 2021; 86: 1008–18.

Supporting Information

Bimodality imaging as a companion of antitumor efficacy of TH-302 in experimental chondrosarcoma

Authors: Roxane Autissier^{1,2,3}; Guilhem Pagés^{2,3}; Erwan Boutault¹; Jean-Marie Bonny^{2,3}; Sébastien Schmitt¹; Philippe Auzeloux¹; Aurélie Dutour⁴; Elisabeth Miot-Noirault¹; Leslie Mazuel^{1,2,3}

Affiliations:

¹Université Clermont Auvergne, Inserm, IMoST, F-63000 Clermont-Ferrand, France

²INRAE, UR QuaPA, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

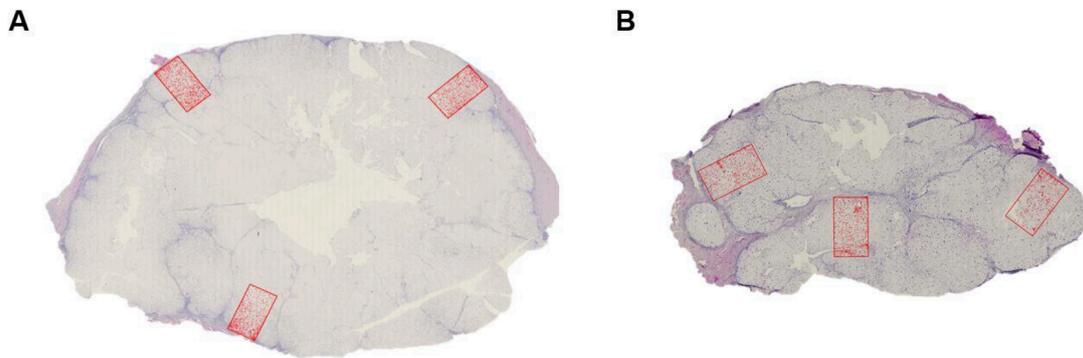
³INRAE, AgroResonance facility, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

⁴Team Cell Death and Pediatric Cancer, Cancer Initiation and Tumor Cell Identity Department, INSERM1052, CNRS5286, Cancer Research Center of Lyon, F-69008 Lyon, France

Corresponding author: Leslie Mazuel

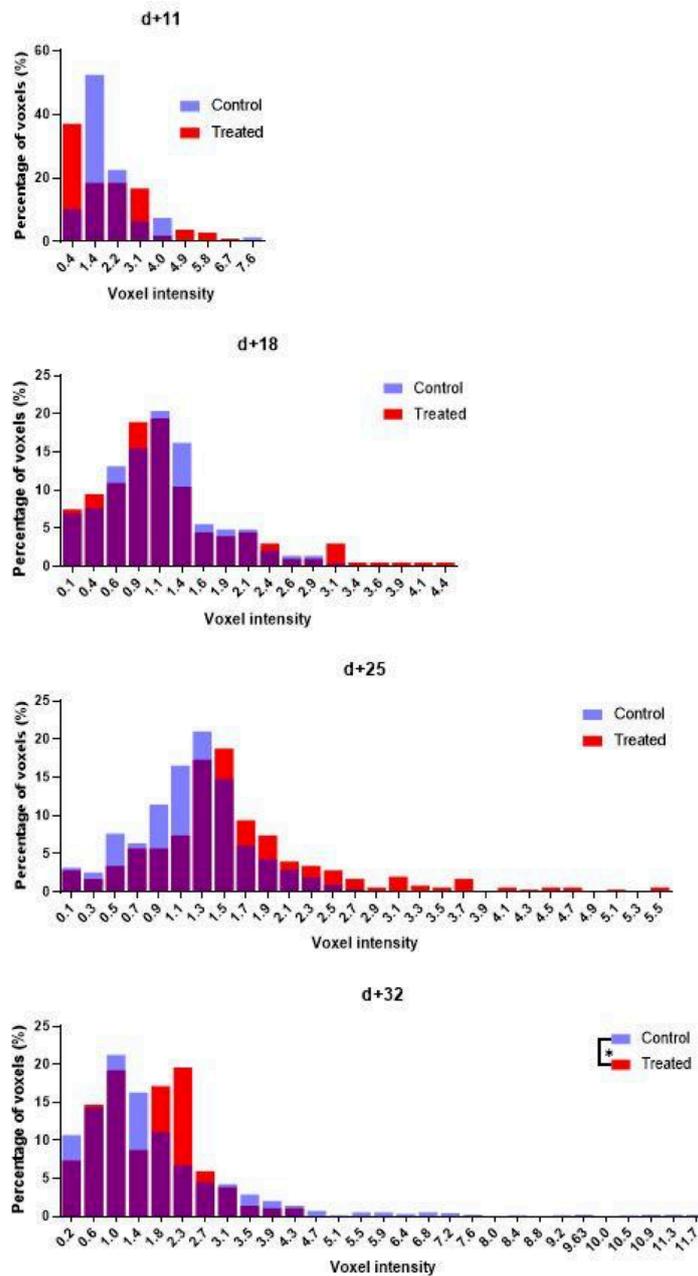
IMoST UMR 1240 INSERM / Université Clermont Auvergne
58, rue Montalembert, 63005 Clermont Ferrand Cedex, France
E-mail : leslie.mazuel@uca.fr

Supporting Information



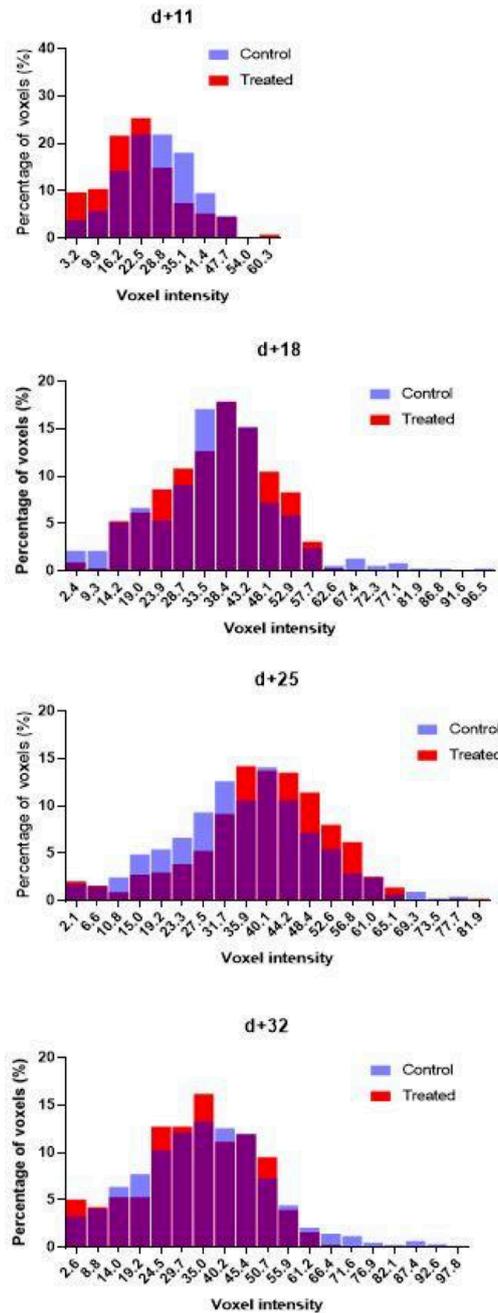
Supplementary figure 1. Examples of ROI localization for IHC and IF quantifications on QuPath software. Three rectangular red ROIs were placed on periphery of different tumor lobules for the control group (A) and the treated group (B). Detected cells were spotted in red.

Supporting Information



Supplementary figure 2. APT / Guanidyl CEST ratio voxels intensity distribution in tumor ROI for TH-302 treated and control groups at d+11, d+18, d+25, d+32. For clarity, only average values of the intensity intervals are represented on x-axis.

Supporting Information



Supplementary figure 3. gagCEST AUC voxels intensity distribution in tumor ROI for TH-302 treated and control groups at d+11, d+18, d+25, d+32. For clarity, only average values of the intensity intervals are represented on x-axis.

Chapitre 4 : Discussion générale

Ce travail de thèse a porté sur la caractérisation du microenvironnement au cours de la croissance tumorale, à l'aide de l'imagerie multimodale *in vivo*, et associée ou non à une thérapie. L'objet d'étude de ce projet a été le chondrosarcome, tumeur maligne du cartilage chimio- et radio-résistante, disposant d'un microenvironnement riche et complexe. Parmi les éléments constituant ce dernier, nous nous sommes intéressés à deux composantes majoritairement impliquées dans ce phénomène de résistance thérapeutique : la matrice extracellulaire et l'hypoxie.

Le chondrosarcome SWARM de rat a été sélectionné pour nos études puisque ce modèle possède à la fois une matrice extracellulaire riche en protéoglycanes, et donc en GAGs, mais également une fraction hypoxique modérée. Ce chondrosarcome est très documenté dans la littérature car il a fait l'objet de plusieurs études *in vivo*, notamment au sein du laboratoire IMoST.^{141,325,402,403} Pour atteindre le premier objectif de thèse qui était la mise au point de l'IRM CEST, un modèle expérimental avec un temps de pousse tumorale rapide était préférable puisque l'étude portait sur une caractérisation à un stade donné. C'est pour cette raison que nous avons choisi un modèle SWARM chez la souris où un fragment de chondrosarcome SWARM a été implanté en sous-cutané entre les omoplates d'animaux immunodéprimés. En revanche, pour réaliser une caractérisation du microenvironnement tumoral au cours d'un suivi longitudinal et évaluer l'efficacité d'un traitement, second objectif de ce travail, il était indispensable de travailler avec un modèle expérimental de chondrosarcome dont le temps de pousse tumorale est plus long et surtout, qui inclut la composante immunitaire. C'est pour cela que la deuxième étude s'est portée sur un modèle expérimental syngénique, le modèle SWARM chez le rat qui consiste en l'implantation d'un fragment de chondrosarcome SWARM en position paratibiale chez des animaux sains. Malgré le fait que cette composante immunitaire n'est pas été étudiée au cours de ces travaux, nous savons qu'elle joue, elle aussi, un rôle fondamental au sein du microenvironnement tumoral.¹⁰⁷ De plus, en implantant directement le fragment de tumeur, contre l'os du tibia, au niveau de la patte du rat, le chondrosarcome peut ainsi se développer au sein d'un environnement osseux qui se rapproche de celui retrouvé en clinique, chez les patients atteints de chondrosarcomes squelettiques.¹⁵⁵

Pour traiter les animaux, nous avons choisi de cibler la fraction hypoxique du microenvironnement tumoral du chondrosarcome, en utilisant une prodrogue activable en hypoxie : l'évofosfamide ou TH-302. Aucune étude, à ce jour, ne fait mention de son utilisation *in vivo* dans le cadre du chondrosarcome. Son efficacité a, néanmoins, été démontrée dans de nombreux cancers, ce

qui a justifié sa sélection.³⁷² L'efficacité de cette thérapie ayant été démontrée sur un modèle animal, une transposition vers des essais cliniques pourrait être envisagée. En effet, la présence de cette molécule dans plusieurs essais cliniques jusqu'en phase III laisse entrevoir la possibilité d'un transfert rapide vers les patients. Une des difficultés de ces études réside dans le recrutement d'un nombre de patients suffisant. Une autre propriété du microenvironnement tumoral qui serait intéressante de cibler, est le remodelage osseux, puisque nous savons que le développement et la progression des chondrosarcomes squelettiques résultent, en partie, de l'interaction de la tumeur avec la niche osseuse.¹⁵⁵ L'acide zolédronique serait alors un traitement de choix, d'autant qu'il est actuellement étudié en essai clinique de phase I pour des patients atteints de chondrosarcomes (NCT03173976). Nous avons également étudié l'efficacité de l'acide zolédronique, ainsi que ses effets sur le microenvironnement tumoral du chondrosarcome SWARM implanté en orthotopique chez le rat, mais les résultats ne sont pas présentés au sein de ce manuscrit.

Dans le but de développer des approches complémentaires d'imagerie fonctionnelle et moléculaire, l'imagerie spectroscopique RMN du proton semblait la piste à privilégier pour l'étude du métabolisme tumoral et du pH.⁴⁰⁴ Malheureusement, cette technique ne peut être appliquée aux modèles de chondrosarcome étudiés dans ce travail. En effet, la nature dense de la matrice extracellulaire et la faible cellularité de cette tumeur rendent impossible l'obtention d'un spectre résolu que ce soit en imagerie ou spectroscopie localisée. Pour obtenir une information métabolique, une autre approche de choix est l'IRM CEST.¹⁶⁶ Nous avons donc choisi de la développer avec comme ambition d'utiliser la dimension fréquentielle du CEST pour suivre simultanément, au cours d'une même acquisition, deux aspects du microenvironnement : la teneur en glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire et les variations de pH retrouvées dans les zones hypoxiques. Nous avons complété notre stratégie d'étude en intégrant l'imagerie nucléaire qui est l'imagerie moléculaire de référence en oncologie clinique. Pour notre étude, nous avons choisi d'utiliser le [¹⁸F]FDG comme radiotracteur du métabolisme tumoral, le [¹⁸F]FMISO comme radiotracteur de l'hypoxie et le [^{99m}Tc]NTP-15-5 permettant le ciblage des charges négatives des protéoglycanes.^{268,403,405}

L'avantage de l'IRM CEST par rapport à l'imagerie nucléaire réside dans le fait qu'elle ne nécessite pas forcément l'injection d'agent de contraste et que la résolution spatiale est plus élevée. En revanche, l'IRM CEST image les échanges chimiques entre des fonctions d'intérêt et l'eau. Elle n'est donc pas spécifique d'un métabolite en particulier. Ainsi, le contraste que nous quantifions autour de 1 ppm peut provenir des GAGs mais également d'autres fonctions hydroxyles, comme celles du glucose ou du lactate.^{195,406} Toutefois, le chondrosarcome est décrit comme étant une tumeur faiblement métabolique;¹⁷ nos résultats obtenus *in vivo* avec l'imagerie TEP au [¹⁸F]FDG et confirmés *ex vivo* par

l'immunomarquage de GLUT1 mais aussi de Ki-67 en témoignent. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la contribution des fonctions hydroxyles du glucose et du lactate, au contraste que nous observons, reste modeste. L'IRM CEST du glucose (glucoCEST) est une méthode basée sur l'étude de la variation du signal CEST après injection de glucose. Le glucoCEST se rapproche alors de l'imagerie au [¹⁸F]FDG, apportant une information sur la consommation en glucose des cellules tumorales (mais nullement sur la quantité endogène de glucose).²⁶⁵ Le glucoCEST n'a pas été utilisé dans cette étude pour plusieurs raisons. Tout d'abord, c'est une approche relativement complexe à mettre en œuvre tant d'un point de vue expérimental que pour l'analyse des données. Ensuite, nous aurions dû injecter du glucose aux animaux, or nous souhaitons nous passer de toute injection pour les acquisitions IRM. Enfin, d'un point de vue éthique, les anesthésies subies par les animaux étaient déjà longues et régulières lors des nombreux examens d'imagerie.

Tout comme le gagCEST, le radiotracer [^{99m}Tc]NTP 15-5 a montré son intérêt dans le suivi longitudinal de la croissance tumorale avec une augmentation de la fixation lors de la croissance tumorale. Une augmentation significative de sa captation à la suite du traitement au TH-302 a été observée, suggérant une modification de la matrice extracellulaire, qui entrainerait une meilleure accessibilité ou une augmentation des charges négatives. Cette hypothèse est soutenue par les résultats du dosage biochimiques des sGAGs et pourrait être confirmée par IRM du sodium, naturellement présent au niveau des charges négatives des protéoglycanes. Ces résultats laissent entrevoir le potentiel du [^{99m}Tc]NTP 15-5 pour le diagnostic précoce des chondrosarcomes et pour le suivi longitudinal de chondrosarcomes de grade 1 et 2, les plus riches en protéoglycanes.¹⁵

La seconde caractéristique que nous avons souhaité visualiser, est l'hypoxie et par conséquent les variations de pH. Nous avons pu cartographier la présence de zones plus ou moins acides au sein du tissu tumoral grâce à l'IRM CEST ainsi que le rapport du signal des fonctions amides sur celui des fonctions guanidyles. En revanche, nous ne sommes pas parvenus à remonter à une valeur absolue de pH_i comme cela a pu être le cas dans certaines études à l'aide de la SRM du phosphore 31.²²² Malgré des essais réalisés à un stade tumoral avancé, nous n'avons pas pu obtenir de signal exploitable par SRM du ³¹P. Comme pour la SRM ¹H, ceci peut s'expliquer par la présence d'une matrice dense et compacte et la faible activité métabolique des chondrocytes tumoraux. De plus, nous pouvons nous interroger quant à la pertinence d'une telle approche en spectroscopie localisée, étant donné la répartition hétérogène de l'hypoxie au sein du volume tumoral. Le pH obtenu n'aurait reflété qu'un pH moyen au sein de la tumeur. Un autre moyen de cartographier le pH *in vivo* est possible en IRM grâce à l'acidoCEST. Cette technique consiste à injecter un produit de contraste tels que le iopamidol ou le iopromide portant des fonctions amides sensibles au pH.⁴⁰⁷ Cette méthode n'a pas été investiguée car un produit de contraste devait être injecté. De plus, ce produit de contraste possédant

des fonctions hydroxyles, deux acquisitions CEST auraient dû être réalisées pour cartographier les GAGs dans un premier temps puis le pH dans un second temps. À notre connaissance, aucune méthode d'imagerie, ne requérant pas d'injection, nous permettrait de remonter à valeur absolue de pH *in vivo*.

Grâce à la cartographie du ratio APT/guanidylCEST, nous avons pu montrer l'importance de l'étude de l'hétérogénéité de l'hypoxie au sein du tissu tumoral. En effet, si l'analyse de ce ratio au niveau de la coupe entière ne montre pas de différence entre les animaux traités et les animaux contrôles, nous avons cependant pu constater, grâce à une analyse plus poussée des données, une différence significative de la répartition des voxels selon leur intensité, entre les deux groupes, à des stades tardifs. Ainsi, de par son aspect résolusif, l'IRM CEST apporte une réelle plus-value à la visualisation de l'hétérogénéité de répartition de l'hypoxie tumorale. Cette analyse fine de la distribution des intensités de chaque voxel semble être une voie prometteuse pour pouvoir, à plus long terme, stratifier les patients en fonction de leur fraction hypoxique tumorale. Cela pourrait permettre de sélectionner les potentiels répondeurs aux thérapies de type prodrogues activables en hypoxie. Pour réaliser cette stratification, non plus sur une seule coupe mais sur l'ensemble de la tumeur, l'enregistrement d'images CEST, multicoupes ou 3D, serait un réel avantage. Dans de telles approches, il est important de garder la même efficacité de la saturation dans les différentes coupes.⁴⁰⁸ Des méthodes ont été récemment proposées et un projet, financé par la Ligue contre le cancer Auvergne-Rhône-Alpes, est actuellement en cours au sein du laboratoire (numéro de projet R224CC). En parallèle, nous avons choisi d'utiliser le [¹⁸F]FMISO pour visualiser l'hypoxie par imagerie TEP. Nous n'avons pas obtenu de résultats significatifs, malgré une tendance, quant à la variation de l'hypoxie au cours de la croissance tumorale ou encore en réponse au TH-302. Bien qu'il fasse partie des radiotraceurs les plus utilisés en préclinique et en clinique, pour la visualisation de l'hypoxie, ce dernier nécessite un temps de distribution relativement long (> 3 h) par rapport à la courte demi-vie du fluor 18 (1h 49min) entraînant, de ce fait, une perte de signal non négligeable. Il présente également un faible rapport signal sur bruit au niveau du microenvironnement tumoral comparativement au système digestif.^{405,409} À l'heure actuelle, d'autres radiotraceurs de l'hypoxie se développent, comme le [⁶⁴Cu]ATSM, avec une demi-vie plus longue (12h 42 min), défini comme le radiotraceur du stress oxydant et indirectement de l'hypoxie puisque l'hypoxie sévère génère un stress oxydatif.⁴¹⁰ Employer le [⁶⁴Cu]ATSM pourrait être pertinent afin d'imager l'hypoxie du microenvironnement tumoral dans le cadre du chondrosarcome.

À ce jour, l'IRM CEST est une méthode de plus en plus utilisée en recherche clinique sur des imageurs opérants principalement à 3T.¹⁶⁸ Le transfert de ces travaux vers l'imagerie clinique est une des principales perspectives de ces travaux de thèse. Malgré la diminution du champ magnétique, ni l'imagerie du pH, ni celle des GAGs, ne devraient poser de problème d'après la littérature.^{411,412} Les développements les plus importants résideront dans le post-traitement des données afin d'apporter un outil clef en main aux médecins pour l'interprétation des examens et le choix de l'orientation thérapeutique des patients. Enfin, avec l'essor des nouvelles technologies TEP/IRM, il pourrait être pertinent de réaliser une étude exploitant le [⁶⁴Cu]NTP 15-5 récemment breveté par le laboratoire IMoST (WO2016016272A1) dans le but d'appliquer notre stratégie d'imagerie multimodale en TEP et non plus en TEMP comme c'est le cas avec le [^{99m}Tc]. Les deux approches d'imagerie pourraient alors être effectuées sur un même imageur et bénéficier, ainsi, d'une meilleure caractérisation spatiale.

Chapitre 5 : Conclusion générale

Dans la première partie de ce travail, nous avons mis au point une méthode d'IRM CEST multi-fréquentielle, nous permettant de visualiser différents contrastes CEST endogènes au cours d'une seule et même acquisition. Nous avons ainsi pu explorer le microenvironnement tumoral avec une haute résolution spatiale et de manière non invasive. Les différentes techniques d'imageries nucléaires ont, de manière complémentaire, participé à cette caractérisation à l'aide de différents radiotraceurs.

La seconde partie du travail a consisté à utiliser cette multimodalité pour suivre le développement du chondrosarcome et explorer les remaniements du microenvironnement tumoral au cours d'une thérapie anti-cancéreuse ciblée. Nous avons montré, pour la première fois, que le TH-302 est efficace *in vivo* dans le traitement d'un modèle préclinique de chondrosarcome.

D'un point de vue plus personnel, ce travail de thèse a été multidisciplinaire. En plus de mes compétences en biologie et en expérimentation animale, j'ai dû acquérir de nouvelles compétences professionnelles telles que la manipulation de produits radioactifs, l'acquisition en imagerie, le traitement des données mais aussi l'analyse par différentes méthodes statistiques. Pour mener à bien ce projet, il était primordial d'échanger régulièrement afin de comprendre les besoins des experts de chaque domaine, tels que les physiciens et les radiochimistes, pour produire des résultats exploitables. Dans une thèse, en général, et lorsqu'elle fait appel à des expérimentations animales, en particulier, la planification est capitale. Il faut notamment prendre en compte certains délais incompressibles, comme le temps d'évaluation par le Comité d'éthique et le MESRI de la saisine, mais aussi le temps d'acclimatation des animaux, le temps de pousse tumorale, etc. Il existe aussi des aléas malgré une organisation rigoureuse. La COVID-19 en fut un, m'obligeant à sacrifier tous les animaux de l'étude, 3 jours avant le début du suivi longitudinal. Ce dernier n'a pu reprendre que, très exactement, un an plus tard.

Mes recherches en imagerie multimodale ont été facilitées grâce à la plateforme d'imagerie « *In Vivo* Imaging Auvergne » ([IVIA](#)) qui regroupe toutes les techniques d'imageries médicales précliniques et cliniques. Ce travail de thèse est devenu un des projets phares de la plateforme. Sa poursuite fera appel aux imageurs cliniques regroupés dans IVIA afin de démontrer l'intérêt d'allier, au sein d'une même structure, des instruments dédiés au petit animal et à l'homme.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Farc O, Cristea V. An overview of the tumor microenvironment, from cells to complex networks (Review). *Exp Ther Med*. 2021;21(1):96.
2. Augustin RC, Delgoffe GM, Najjar YG. Characteristics of the Tumor Microenvironment That Influence Immune Cell Functions: Hypoxia, Oxidative Stress, Metabolic Alterations. *Cancers*. 2020;12(12):3802.
3. Choi JH, Ro JY. The 2020 WHO Classification of Tumors of Bone: An Updated Review. *Advances in Anatomic Pathology*. 2021;28(3):119-138.
4. Casali PG, Bielack S, Abecassis N, et al. Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018;29(Suppl 4):iv79-iv95.
5. Valery PC, Laversanne M, Bray F. Bone cancer incidence by morphological subtype: a global assessment. *Cancer Causes Control*. 2015;26(8):1127-1139.
6. ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014;25 Suppl 3:iii113-123.
7. Lichtenstein L, Jaffe HL. Chondrosarcoma of Bone. *Am J Pathol*. 1943;19(4):553-589.
8. Damron TA, Ward WG, Stewart A. Osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma: National Cancer Data Base Report. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;459:40-47.
9. Nota SPFT, Braun Y, Schwab JH, van Dijk CN, Bramer JAM. The Identification of Prognostic Factors and Survival Statistics of Conventional Central Chondrosarcoma. *Sarcoma*. 2015;2015.
10. Thanindratarn P, Dean DC, Nelson SD, Hornicek FJ, Duan Z. Advances in immune checkpoint inhibitors for bone sarcoma therapy. *J Bone Oncol*. 2019;15:100221.
11. Douis H, Saifuddin A. The imaging of cartilaginous bone tumours. II. Chondrosarcoma. *Skeletal Radiol*. 2013;42(5):611-626.
12. Bovée JVMG, Hogendoorn PCW, Wunder JS, Alman BA. Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(7):481-488.
13. Chow WA. Chondrosarcoma: biology, genetics, and epigenetics. *F1000Res*. 2018;7.
14. Murphey MD, Walker EA, Wilson AJ, Kransdorf MJ, Temple HT, Gannon FH. From the archives of the AFIP: imaging of primary chondrosarcoma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*. 2003;23(5):1245-1278.
15. Kim MJ, Cho KJ, Ayala AG, Ro JY. Chondrosarcoma: with updates on molecular genetics. *Sarcoma*. 2011;2011:405437.
16. Zajęc AE, Kopeć S, Szostakowski B, et al. Chondrosarcoma-from Molecular Pathology to Novel Therapies. *Cancers (Basel)*. 2021;13(10):2390.

17. Gelderblom H, Hogendoorn PCW, Dijkstra SD, et al. The clinical approach towards chondrosarcoma. *Oncologist*. 2008;13(3):320-329.
18. Amer KM, Munn M, Congiusta D, Abraham JA, Basu Mallick A. Survival and Prognosis of Chondrosarcoma Subtypes: SEER Database Analysis. *J Orthop Res*. 2020;38(2):311-319.
19. CDM F, KK U, F M. *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*.
20. Evans HL, Ayala AG, Romsdahl MM. Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. *Cancer*. 1977;40(2):818-831.
21. Board WC of TE. *Soft Tissue and Bone Tumours*.
22. Limaiem F, Davis DD, Sticco KL. Chondrosarcoma. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2020.
23. Jo VY, Fletcher CDM. WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition. *Pathology*. 2014;46(2):95-104.
24. Brochure : les sarcomes osseux | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer.
25. Schaap FG, French PJ, Bovée JVMG. Mutations in the isocitrate dehydrogenase genes IDH1 and IDH2 in tumors. *Adv Anat Pathol*. 2013;20(1):32-38.
26. Tarpey PS, Behjati S, Cooke SL, et al. Frequent mutation of the major cartilage collagen gene COL2A1 in chondrosarcoma. *Nat Genet*. 2013;45(8):923-926.
27. Polychronidou G, Karavasilis V, Pollack SM, Huang PH, Lee A, Jones RL. Novel therapeutic approaches in chondrosarcoma. *Future Oncol*. 2017;13(7):637-648.
28. Speetjens FM, de Jong Y, Gelderblom H, Bovée JVMG. Molecular oncogenesis of chondrosarcoma: impact for targeted treatment. *Curr Opin Oncol*. 2016;28(4):314-322.
29. Schrage YM, Lam S, Jochemsen AG, et al. Central chondrosarcoma progression is associated with pRb pathway alterations: CDK4 down-regulation and p16 overexpression inhibit cell growth in vitro. *J Cell Mol Med*. 2009;13(9A):2843-2852.
30. Zhang YX, van Oosterwijk JG, Sicinska E, et al. Functional profiling of receptor tyrosine kinases and downstream signaling in human chondrosarcomas identifies pathways for rational targeted therapy. *Clin Cancer Res*. 2013;19(14):3796-3807.
31. Bovée JV, Cleton-Jansen AM, Kuipers-Dijkshoorn NJ, et al. Loss of heterozygosity and DNA ploidy point to a diverging genetic mechanism in the origin of peripheral and central chondrosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999;26(3):237-246.
32. Letson GD, Muro-Cacho CA. Genetic and molecular abnormalities in tumors of the bone and soft tissues. *Cancer Control*. 2001;8(3):239-251.
33. Gil-Benso R, Lopez-Gines C, López-Guerrero JA, et al. Establishment and Characterization of a Continuous Human Chondrosarcoma Cell Line, ch-2879: Comparative Histologic and Genetic Studies with Its Tumor of Origin. *Lab Invest*. 2003;83(6):877-887.
34. Jin Z, Han YX, Han XR. Loss of RUNX3 expression may contribute to poor prognosis in patients with chondrosarcoma. *J Mol Histol*. 2013;44(6):645-652.

35. Venneker S, Kruisselbrink AB, Baranski Z, et al. Beyond the Influence of IDH Mutations: Exploring Epigenetic Vulnerabilities in Chondrosarcoma. *Cancers*. 2020;12(12):3589.
36. Girard N, Bazille C, Lhuissier E, et al. 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an Inhibitor of the Histone Methyltransferase EZH2, Induces Apoptosis and Reduces Cell Migration in Chondrosarcoma Cells. Alonso MM, ed. *PLoS ONE*. 2014;9(5):e98176.
37. Parafioriti A, Cifola I, Gissi C, et al. Expression profiling of microRNAs and isomiRs in conventional central chondrosarcoma. *Cell Death Discov*. 2020;6:46.
38. Tsai CH, Tsai HC, Huang HN, et al. Resistin promotes tumor metastasis by down-regulation of miR-519d through the AMPK/p38 signaling pathway in human chondrosarcoma cells. *Oncotarget*. 2015;6(1):258-270.
39. Chen C, Tian A, Zhou H, Zhang X, Liu Z, Ma X. Upregulation of miR-211 Promotes Chondrosarcoma Development via Targeting Tumor Suppressor VHL. *OTT*. 2020;Volume 13:2935-2943.
40. ESMO. Bone Sarcomas: A Guide for Patients.
41. Gulia A, Gupta S, Kurisunkal V, Puri A. Importance of Skeletal Staging in Chondrosarcoma of Bone: Results of Survey on Current Practices Among Musculoskeletal Oncologists. *IJO*. 2021;55(S1):234-240.
42. Blay JY, Soibinet P, Penel N, et al. Improved survival using specialized multidisciplinary board in sarcoma patients. *Ann Oncol*. 2017;28(11):2852-2859.
43. McLoughlin E, Davies AM, Iqbal A, James SL, Botchu R. The diagnostic significance of pulmonary nodules on CT thorax in chondrosarcoma of bone. *Clinical Radiology*. 2020;75(5):395.e7-395.e16.
44. Oliveira I, Singla N, Chavda A, Saifuddin A. The value of chest and skeletal staging studies in conventional chondrosarcoma. *Skeletal Radiol*. 2021;50(1):125-135.
45. Sharif B, Rajakulasingam R, Sharifi S, O'Donnell P, Saifuddin A. MRI features of low-grade and high-grade chondrosarcoma in enchondromatosis. *Skeletal Radiol*. Published online January 23, 2021.
46. Deckers C, Steyvers MJ, Hannink G, Schreuder HWB, de Rooy JWJ, Van Der Geest ICM. Can MRI differentiate between atypical cartilaginous tumors and high-grade chondrosarcoma? A systematic review. *Acta Orthopaedica*. 2020;91(4):471-478.
47. Sharma AE, Pytel P, Cipriani NA. SOX9 and SATB2 immunohistochemistry cannot reliably distinguish between osteosarcoma and chondrosarcoma on biopsy material. *Human Pathology*. 2022;121:56-64.
48. Aran V, Devalle S, Meohas W, et al. Osteosarcoma, chondrosarcoma and Ewing sarcoma: Clinical aspects, biomarker discovery and liquid biopsy. *Crit Rev Oncol Hematol*. Published online April 21, 2021:103340.
49. Lyskjaer I, Davies C, Strobl AC, et al. Circulating tumour DNA is a promising biomarker for risk stratification of central chondrosarcoma with IDH1/2 and GNAS mutations. *Mol Oncol*. 2021;15(12):3679-3690.

50. Weiner SD. Enchondroma and chondrosarcoma of bone: clinical, radiologic, and histologic differentiation. *Instr Course Lect.* 2004;53:645-649.
51. Miwa S, Yamamoto N, Hayashi K, et al. A Radiological Scoring System for Differentiation between Enchondroma and Chondrosarcoma. *Cancers (Basel).* 2021;13(14):3558.
52. Strauss SJ, Frezza AM, Abecassis N, et al. Bone sarcomas: ESMO–EURACAN–GENTURIS–ERN PaedCan Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up☆. *Annals of Oncology.* 2021;32(12):1520-1536.
53. Fromm J, Klein A, Baur-Melnyk A, et al. Survival and prognostic factors in conventional central chondrosarcoma. *BMC Cancer.* 2018;18(1):849.
54. Dierselhuis EF, Goulding KA, Stevens M, Jutte PC. Intralesional treatment versus wide resection for central low-grade chondrosarcoma of the long bones. Cochrane Gynaecological, Neuro-oncology and Orphan Cancer Group, ed. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2019;2019(4).
55. Deckers C, Leijer EM, Flucke U, et al. Curettage and cryosurgery for enchondroma and atypical cartilaginous tumors of the long bones: Oncological results of a large series. *J Surg Oncol.* 2021;123(8):1821-1827.
56. Laitinen MK, Parry MC, Le Nail LR, Wigley CH, Stevenson JD, Jeys LM. Locally recurrent chondrosarcoma of the pelvis and limbs can only be controlled by wide local excision. *The Bone & Joint Journal.* 2019;101-B(3):266-271.
57. Lee FY, Mankin HJ, Fondren G, et al. Chondrosarcoma of bone: an assessment of outcome. *J Bone Joint Surg Am.* 1999;81(3):326-338.
58. Fiorenza F, Abudu A, Grimer RJ, et al. Risk factors for survival and local control in chondrosarcoma of bone. *J Bone Joint Surg Br.* 2002;84(1):93-99.
59. Andreou D, Ruppin S, Fehlberg S, Pink D, Werner M, Tunn PU. Survival and prognostic factors in chondrosarcoma: results in 115 patients with long-term follow-up. *Acta Orthop.* 2011;82(6):749-755.
60. Mery B, Espenel S, Guy JB, et al. Biological aspects of chondrosarcoma: Leaps and hurdles. *Crit Rev Oncol Hemat.* 2018;126:32-36.
61. Catanzano AA, Kerr DL, Lazarides AL, et al. Revisiting the Role of Radiation Therapy in Chondrosarcoma: A National Cancer Database Study. *Sarcoma.* 2019;2019:1-9.
62. Riva G, Cavallo I, Gandini S, et al. Particle Radiotherapy for Skull Base Chondrosarcoma: A Clinical Series from Italian National Center for Oncological Hadrontherapy. *Cancers (Basel).* 2021;13(17):4423.
63. Weber DC, Murray F, Combescure C, et al. Long term outcome of skull-base chondrosarcoma patients treated with high-dose proton therapy with or without conventional radiation therapy. *Radiotherapy and Oncology.* 2018;129(3):520-526.
64. van Maldegem AM, Gelderblom H, Palmerini E, et al. Outcome of advanced, unresectable conventional central chondrosarcoma. *Cancer.* 2014;120(20):3159-3164.

65. Italiano A, Mir O, Cioffi A, et al. Advanced chondrosarcomas: role of chemotherapy and survival. *Ann Oncol*. 2013;24(11):2916-2922.
66. Fox E, Patel S, Wathen JK, et al. Phase II Study of Sequential Gemcitabine Followed by Docetaxel for Recurrent Ewing Sarcoma, Osteosarcoma, or Unresectable or Locally Recurrent Chondrosarcoma: Results of Sarcoma Alliance for Research Through Collaboration Study 003. *Oncologist*. 2012;17(3):321.
67. van Maldegem AM, Bovée JV, Gelderblom H. Comprehensive analysis of published studies involving systemic treatment for chondrosarcoma of bone between 2000 and 2013. *Clin Sarcoma Res*. 2014;4:11.
68. Mitchell AD, Ayoub K, Mangham DC, Grimer RJ, Carter SR, Tillman RM. Experience in the treatment of dedifferentiated chondrosarcoma. *J Bone Joint Surg Br*. 2000;82(1):55-61.
69. Kawaguchi S, Sun T, Lin PP, Deavers M, Harun N, Lewis VO. Does Ifosfamide Therapy Improve Survival of Patients With Dedifferentiated Chondrosarcoma? *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 2014;472(3):983-989.
70. Qin J, Shaukat I, Mainard D, Netter P, Barré L, Ouzzine M. Constitutive activation of EGFR is associated with tumor progression and plays a prominent role in malignant phenotype of chondrosarcoma. *Oncotarget*. 2019;10(34):3166-3182.
71. Chow W, Frankel P, Ruel C, et al. Results of a prospective phase 2 study of pazopanib in patients with surgically unresectable or metastatic chondrosarcoma. *Cancer*. 2020;126(1):105-111.
72. Tsavaris O, Economopoulou P, Kotsantis I, et al. Clinical Benefit of Pazopanib in a Patient with Metastatic Chondrosarcoma: A Case Report and Review of the Literature. *Front Oncol*. 2018;8:45.
73. Bernstein-Molho R, Kollender Y, Issakov J, et al. Clinical activity of mTOR inhibition in combination with cyclophosphamide in the treatment of recurrent unresectable chondrosarcomas. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;70(6):855-860.
74. Perez J, Decouvelaere AV, Pointecouteau T, et al. Inhibition of Chondrosarcoma Growth by mTOR Inhibitor in an In Vivo Syngeneic Rat Model. Ulasov I, ed. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e32458.
75. Vlahovic G, Meadows KL, Hatch AJ, et al. A Phase I Trial of the IGF-1R Antibody Ganitumab (AMG 479) in Combination with Everolimus (RAD001) and Panitumumab in Patients with Advanced Cancer. *The Oncologist*. 2018;23(7):782-790.
76. Li J, Wang L, Liu Z, et al. MicroRNA-494 inhibits cell proliferation and invasion of chondrosarcoma cells in vivo and in vitro by directly targeting SOX9. *Oncotarget*. 2015;6(28):26216-26229.
77. Bao X, Ren T, Huang Y, et al. Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR increases miR-454-3p by targeting Stat3 and Atg12 to inhibit chondrosarcoma growth. *Cell Death Dis*. 2017;8(2):e2605.
78. Zhang P, Li J, Song Y, Wang X. MiR-129-5p Inhibits Proliferation and Invasion of Chondrosarcoma Cells by Regulating SOX4/Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42(1):242-253.

79. Urdinez J, Boro A, Mazumdar A, et al. The miR-143/145 Cluster, a Novel Diagnostic Biomarker in Chondrosarcoma, Acts as a Tumor Suppressor and Directly Inhibits Fascin-1. *J Bone Miner Res.* 2020;35(6):1077-1091.
80. Sun X, Chen Y, Yu H, et al. Anti-miRNA Oligonucleotide Therapy for Chondrosarcoma. *Mol Cancer Ther.* 2019;18(11):2021-2029.
81. Song Y dong, Zhang K fei, Liu D, et al. Inhibition of EGFR-induced glucose metabolism sensitizes chondrosarcoma cells to cisplatin. *Tumour Biol.* 2014;35(7):7017-7024.
82. Hua G, Liu Y, Li X, Xu P, Luo Y. Targeting glucose metabolism in chondrosarcoma cells enhances the sensitivity to doxorubicin through the inhibition of lactate dehydrogenase-A. *Oncol Rep.* 2014;31(6):2727-2734.
83. Lohberger B, Leithner A, Stuendl N, Kaltenecker H, Kullich W, Steinecker-Frohnwieser B. Diacerein retards cell growth of chondrosarcoma cells at the G2/M cell cycle checkpoint via cyclin B1/CDK1 and CDK2 downregulation. *BMC Cancer.* 2015;15:891.
84. Ouyang Z, Wang S, Zeng M, et al. Therapeutic effect of palbociclib in chondrosarcoma: implication of cyclin-dependent kinase 4 as a potential target. *Cell Commun Signal.* 2019;17(1):17.
85. Su CM, Chen CY, Lu T, et al. A novel benzofuran derivative, ACDB, induces apoptosis of human chondrosarcoma cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Oncotarget.* 2016;7(50):83530-83543.
86. de Jong Y, Monderer D, Brandinelli E, et al. Bcl-xl as the most promising Bcl-2 family member in targeted treatment of chondrosarcoma. *Oncogenesis.* 2018;7(9):74.
87. Li L, Paz AC, Wilky BA, et al. Treatment with a Small Molecule Mutant IDH1 Inhibitor Suppresses Tumorigenic Activity and Decreases Production of the Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate in Human Chondrosarcoma Cells. *PLoS One.* 2015;10(9):e0133813.
88. Nakagawa M, Nakatani F, Matsunaga H, et al. Selective inhibition of mutant IDH1 by DS-1001b ameliorates aberrant histone modifications and impairs tumor activity in chondrosarcoma. *Oncogene.* 2019;38(42):6835-6849.
89. Fan B, Mellinghoff IK, Wen PY, et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of ivosidenib, an oral, targeted inhibitor of mutant IDH1, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs.* 2020;38(2):433-444.
90. Hamm CA, Xie H, Costa FF, et al. Global demethylation of rat chondrosarcoma cells after treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine results in increased tumorigenicity. *PLoS One.* 2009;4(12):e8340.
91. Lhuissier E, Aury-Landas J, Lenté M, Boumediene K, Baugé C. Co-Treatment with the Epigenetic Drug, 3-Deazaneplanocin A (DZNep) and Cisplatin after DZNep Priming Enhances the Response to Platinum-Based Therapy in Chondrosarcomas. *Cancers (Basel).* 2021;13(18):4648.
92. Zhu J, Gu J, Ma J, Xu Z, Tao H. Histone deacetylase inhibitors repress chondrosarcoma cell proliferation. *J BUON.* 2015;20(1):269-274.

93. Sheikh TN, Chen X, Xu X, et al. Growth Inhibition and Induction of Innate Immune Signaling of Chondrosarcomas with Epigenetic Inhibitors. *Mol Cancer Ther.* 2021;20(12):2362-2371.
94. Campbell VT, Nadesan P, Ali SA, et al. Hedgehog pathway inhibition in chondrosarcoma using the smoothed inhibitor IPI-926 directly inhibits sarcoma cell growth. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(5):1259-1269.
95. Xiang W, Jiang T, Guo F, et al. Hedgehog pathway inhibitor-4 suppresses malignant properties of chondrosarcoma cells by disturbing tumor ciliogenesis. *Oncol Rep.* 2014;32(4):1622-1630.
96. Italiano A, Le Cesne A, Bellera C, et al. GDC-0449 in patients with advanced chondrosarcomas: a French Sarcoma Group/US and French National Cancer Institute Single-Arm Phase II Collaborative Study. *Ann Oncol.* 2013;24(11):2922-2926.
97. Bovée JVMG, Cleton-Jansen AM, Taminiau AHM, Hogendoorn PCW. Emerging pathways in the development of chondrosarcoma of bone and implications for targeted treatment. *Lancet Oncol.* 2005;6(8):599-607.
98. Lunt SJ, Fyles A, Hill RP, Milosevic M. Interstitial fluid pressure in tumors: therapeutic barrier and biomarker of angiogenesis. *Future Oncology.* 2008;4(6):793-802.
99. Graham K, Unger E. Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. *International Journal of Nanomedicine.* 2018;Volume 13:6049-6058.
100. Kouvaras E, Christoni Z, Siasios I, Malizos K, Koukoulis GK, Ioannou M. Hypoxia-inducible factor 1-alpha and vascular endothelial growth factor in cartilage tumors. *Biotech Histochem.* 2019;94(4):283-289.
101. Kubo T, Sugita T, Shimose S, Matsuo T, Arihiro K, Ochi M. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. *J Bone Joint Surg Br.* 2008;90(3):364-370.
102. Boeuf S, Bovée JVMG, Lehner B, Hogendoorn PCW, Richter W. Correlation of hypoxic signalling to histological grade and outcome in cartilage tumours. *Histopathology.* 2010;56(5):641-651.
103. Rosier RN, O'Keefe RJ, Teot LA, et al. P-glycoprotein expression in cartilaginous tumors. *J Surg Oncol.* 1997;65(2):95-105.
104. Kim DW, Kim KO, Shin MJ, et al. siRNA-based targeting of antiapoptotic genes can reverse chemoresistance in P-glycoprotein expressing chondrosarcoma cells. *Mol Cancer.* 2009;8(1):28.
105. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery.* 2022;12(1):31-46.
106. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(5):392-401.
107. Simard FA, Richert I, Vandermoeten A, et al. Description of the immune microenvironment of chondrosarcoma and contribution to progression. *Oncoimmunology.* 2017;6(2):e1265716.
108. Théoleyre S, Mori K, Cherrier B, et al. Phenotypic and functional analysis of lymphocytes infiltrating osteolytic tumors: use as a possible therapeutic approach of osteosarcoma. *BMC Cancer.* 2005;5:123.

109. Hu W, Wang G, Huang D, Sui M, Xu Y. Cancer Immunotherapy Based on Natural Killer Cells: Current Progress and New Opportunities. *Front Immunol*. 2019;10.
110. Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54(8):721-728.
111. Kostine M, Cleven AH, de Miranda NFCC, Italiano A, Cleton-Jansen AM, Bovée JVMG. Analysis of PD-L1, T-cell infiltrate and HLA expression in chondrosarcoma indicates potential for response to immunotherapy specifically in the dedifferentiated subtype. *Mod Pathol*. 2016;29(9):1028-1037.
112. Iseulys R, Anne GB, Corinne B, et al. The immune landscape of chondrosarcoma reveals an immunosuppressive environment in the dedifferentiated subtypes and exposes CSFR1+ macrophages as a promising therapeutic target. *J Bone Oncol*. 2019;20:100271.
113. Li B, Li G, Yan X, et al. Fresh Tissue Multi-omics Profiling Reveals Immune Classification and Suggests Immunotherapy Candidates for Conventional Chondrosarcoma. *Clinical Cancer Research*. 2021;27(23):6543-6558.
114. Kalinski T, Sel S, Kouznetsova I, Röpke M, Roessner A. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in cartilage tumors. *Pathol Res Pract*. 2009;205(5):339-345.
115. Supuran CT. Carbonic Anhydrase Inhibition and the Management of Hypoxic Tumors. *Metabolites*. 2017;7(3).
116. Luo D, Ren H, Zhang W, Xian H, Lian K, Liu H. 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*. 2019;14(1):56.
117. Hu X, Li L, Eid JE, et al. IDH1 Mutation Induces HIF-1 α and Confers Angiogenic Properties in Chondrosarcoma JJ012 Cells. *Dis Markers*. 2022;2022:7729968.
118. Chen C, Ma Q, Ma X, Liu Z, Liu X. Association of Elevated HIF-2 α Levels with Low Beclin 1 Expression and Poor Prognosis in Patients with Chondrosarcoma. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(8):2364-2372.
119. Kim H, Cho Y, Kim HS, et al. A system-level approach identifies HIF-2 α as a critical regulator of chondrosarcoma progression. *Nat Commun*. 2020;11(1):5023.
120. Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med*. 2010;14(4):771-794.
121. Rozeman LB, Hameetman L, van Wezel T, et al. cDNA expression profiling of chondrosarcomas: Ollier disease resembles solitary tumours and alteration in genes coding for components of energy metabolism occurs with increasing grade. *J Pathol*. 2005;207(1):61-71.
122. Wu W, Zhao S. Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2013;45(1):18-26.
123. Di Pompo G, Cortini M, Baldini N, Avnet S. Acid Microenvironment in Bone Sarcomas. *Cancers*. 2021;13(15):3848.

124. Corbet C, Draoui N, Polet F, et al. The SIRT1/HIF2 α Axis Drives Reductive Glutamine Metabolism under Chronic Acidosis and Alters Tumor Response to Therapy. *Cancer Research*. 2014;74(19):5507-5519.
125. Corbet C, Feron O. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(10):577-593.
126. Perut F, Avnet S, Fotia C, et al. V-ATPase as an effective therapeutic target for sarcomas. *Experimental Cell Research*. 2014;320(1):21-32.
127. Emon B, Bauer J, Jain Y, Jung B, Saif T. Biophysics of Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis - A Mini Review. *Comput Struct Biotechnol J*. 2018;16:279-287.
128. Jawad MU, Garamszegi N, Garamszegi SP, et al. Matrix Metalloproteinase 1: Role in Sarcoma Biology. Deb S, ed. *PLoS ONE*. 2010;5(12):e14250.
129. Sugita H, Osaka S, Toriyama M, et al. Correlation between the histological grade of chondrosarcoma and the expression of MMPs, ADAMTSs and TIMPs. *Anticancer Res*. 2004;24(6):4079-4084.
130. Malcherczyk D, Heyse TJ, El-Zayat BF, et al. Expression of MMP-9 decreases metastatic potential of Chondrosarcoma: an immunohistochemical study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2018;19(1):9.
131. Sun X, Wei L, Chen Q, Terek RM. CXCR4/SDF1 mediate hypoxia induced chondrosarcoma cell invasion through ERK signaling and increased MMP1 expression. *Mol Cancer*. 2010;9:17.
132. Bai S, Wang D, Klein MJ, Siegal GP. Characterization of CXCR4 expression in chondrosarcoma of bone. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(6):753-758.
133. Lin C, McGough R, Aswad B, Block JA, Terek R. Hypoxia induces HIF-1 α and VEGF expression in chondrosarcoma cells and chondrocytes. *J Orthop Res*. 2004;22(6):1175-1181.
134. Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol*. 2011;209(2):139-151.
135. Aigner T, Müller S, Neureiter D, Illstrup DM, Kirchner T, Björnsson J. Prognostic relevance of cell biologic and biochemical features in conventional chondrosarcomas. *Cancer*. 2002;94(8):2273-2281.
136. Aigner T, Dertinger S, Vornehm SI, Dudhia J, von der Mark K, Kirchner T. Phenotypic diversity of neoplastic chondrocytes and extracellular matrix gene expression in cartilaginous neoplasms. *Am J Pathol*. 1997;150(6):2133-2141.
137. Schwab JH, Boland PJ, Agaram NP, et al. Chordoma and chondrosarcoma gene profile: implications for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58(3):339-349.
138. Stevens JW. Swarm chondrosarcoma: a continued resource for chondroblastic-like extracellular matrix and chondrosarcoma biology research. *Connect Tissue Res*. 2013;54(4-5):252-259.
139. Aigner T. Towards a new understanding and classification of chondrogenic neoplasias of the skeleton--biochemistry and cell biology of chondrosarcoma and its variants. *Virchows Arch*. 2002;441(3):219-230.

140. Mörgelin M, Heinegård D, Engel J, Paulsson M. Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure. *J Biol Chem*. 1992;267(9):6137-6141.
141. Hamm CA, Stevens JW, Xie H, et al. Microenvironment alters epigenetic and gene expression profiles in Swarm rat chondrosarcoma tumors. *BMC Cancer*. 2010;10(1):471.
142. Kimata K, Foidart JM, Pennypacker JP, Kleinman HK, Martin GR, Hewitt AT. Immunofluorescence localization of fibronectin in chondrosarcoma cartilage matrix. *Cancer Res*. 1982;42(6):2384-2391.
143. Lieleg O, Baumgärtel RM, Bausch AR. Selective Filtering of Particles by the Extracellular Matrix: An Electrostatic Bandpass. *Biophysical Journal*. 2009;97(6):1569-1577.
144. Rédini F. [Structure and regulation of articular cartilage proteoglycan expression]. *Pathol Biol*. 2001;49(4):364-375.
145. Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):237-246.
146. Wasa J, Nishida Y, Shinomura T, et al. Versican V1 isoform regulates cell-associated matrix formation and cell behavior differentially from aggrecan in Swarm rat chondrosarcoma cells. *International Journal of Cancer*. 2012;130(10):2271-2281.
147. Söder S, Oliveira AM, Inwards CY, Müller S, Aigner T. Type II collagen, but not aggrecan expression, distinguishes clear cell chondrosarcoma and chondroblastoma. *Pathology*. 2006;38(1):35-38.
148. Dornauer K, Söder S, Inwards CY, Bovee JVMG, Aigner T. Matrix biochemistry and cell biology of dedifferentiated chondrosarcomas. *Pathol Int*. 2010;60(5):365-372.
149. Wiberg C, Klatt AR, Wagener R, et al. Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan. *J Biol Chem*. 2003;278(39):37698-37704.
150. Herwig J, Roessner A, Buddecke E. Isolation and characterization of proteoglycans and glycosaminoglycans from human chondrosarcoma. *Exp Mol Pathol*. 1986;45(2):118-127.
151. Fede C, Stecco C, Angelini A, et al. Variations in contents of hyaluronan in the peritumoral micro-environment of human chondrosarcoma. *J Orthop Res*. 2019;37(2):503-509.
152. Hamada S, Nishida Y, Zhuo L, et al. Suppression of hyaluronan synthesis attenuates the tumorigenicity of low-grade chondrosarcoma. *J Orthop Res*. 2018;36(6):1573-1580.
153. Hou CH, Hsiao YC, Fong YC, Tang CH. Bone morphogenetic protein-2 enhances the motility of chondrosarcoma cells via activation of matrix metalloproteinase-13. *Bone*. 2009;44(2):233-242.
154. Grimaud E, Damiens C, Rousselle AV, Passuti N, Heymann D, Gouin F. Bone remodelling and tumour grade modifications induced by interactions between bone and swarm rat chondrosarcoma. *Histol Histopathol*. 2002;17(4):1103-1111.

155. David E, Blanchard F, Heymann MF, et al. The Bone Niche of Chondrosarcoma: A Sanctuary for Drug Resistance, Tumour Growth and also a Source of New Therapeutic Targets. *Sarcoma*. 2011;2011:1-8.
156. Jeong W, Kim HJ. Biomarkers of chondrosarcoma. *J Clin Pathol*. 2018;71(7):579-583.
157. Tang CH, Yamamoto A, Lin YT, Fong YC, Tan TW. Involvement of matrix metalloproteinase-3 in CCL5/CCR5 pathway of chondrosarcomas metastasis. *Biochemical Pharmacology*. 2010;79(2):209-217.
158. Chen YJ, Wei YY, Chen HT, et al. Osteopontin increases migration and MMP-9 up-regulation via α v β 3 integrin, FAK, ERK, and NF- κ B-dependent pathway in human chondrosarcoma cells. *J Cell Physiol*. 2009;221(1):98-108.
159. Hsu CJ, Lin TY, Kuo CC, et al. Involvement of integrin up-regulation in RANKL/RANK pathway of chondrosarcomas migration. *J Cell Biochem*. 2010;111(1):138-147.
160. Rutkowski P, Kamińska J, Kowalska M, Ruka W, Steffen J. Cytokine and cytokine receptor serum levels in adult bone sarcoma patients: correlations with local tumor extent and prognosis. *J Surg Oncol*. 2003;84(3):151-159.
161. Forsén S, Hoffman RA. Study of Moderately Rapid Chemical Exchange Reactions by Means of Nuclear Magnetic Double Resonance. *The Journal of Chemical Physics*. 1963;39(11):2892-2901.
162. Wolff SD, Balaban RS. Magnetization transfer contrast (MTC) and tissue water proton relaxation in vivo. *Magn Reson Med*. 1989;10(1):135-144.
163. Zhou J, Zijl PCM van. Chemical exchange saturation transfer imaging and spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2006;48(2-3):109-136.
164. Ward KM, Aletras AH, Balaban RS. A new class of contrast agents for MRI based on proton chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *J Magn Reson*. 2000;143(1):79-87.
165. Wu B, Warnock G, Zaiss M, et al. An overview of CEST MRI for non-MR physicists. *EJNMMI Phys*. 2016;3(1):19.
166. Gao T, Zou C, Li Y, Jiang Z, Tang X, Song X. A Brief History and Future Prospects of CEST MRI in Clinical Non-Brain Tumor Imaging. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21):11559.
167. Heo HY, Zhang Y, Jiang S, Zhou J. Influences of experimental parameters on chemical exchange saturation transfer (CEST) metrics of brain tumors using animal models at 4.7T. *Magn Reson Med*. 2019;81(1):316-330.
168. Jones KM, Pollard AC, Pagel MD. Clinical applications of chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI. *J Magn Reson Imaging*. 2018;47(1):11-27.
169. Kim M, Gillen J, Landman BA, Zhou J, van Zijl PCM. Water saturation shift referencing (WASSR) for chemical exchange saturation transfer (CEST) experiments: Water Shift Referencing for CEST Imaging. *Magn Reson Med*. 2009;61(6):1441-1450.
170. Schuenke P, Windschuh J, Roeloffs V, Ladd ME, Bachert P, Zaiss M. Simultaneous mapping of water shift and B1 (WASABI)-Application to field-Inhomogeneity correction of CEST MRI data. *Magn Reson Med*. 2017;77(2):571-580.

171. van Zijl PCM, Lam WW, Xu J, Knutsson L, Stanisiz GJ. Magnetization Transfer Contrast and Chemical Exchange Saturation Transfer MRI. Features and Analysis of the Field-Dependent Saturation Spectrum. *Neuroimage*. 2018;168:222-241.
172. Jin T, Wang P, Zong X, Kim SG. MR imaging of the Amide-Proton Transfer effect and the pH-insensitive Nuclear Overhauser Effect at 9.4 T. *Magn Reson Med*. 2013;69(3):760-770.
173. Guivel-Scharen V, Sinnwell T, Wolff SD, Balaban RS. Detection of proton chemical exchange between metabolites and water in biological tissues. *J Magn Reson*. 1998;133(1):36-45.
174. Vinogradov E, Sherry AD, Lenkinski RE. CEST: From basic principles to applications, challenges and opportunities. *Journal of Magnetic Resonance*. 2013;229:155-172.
175. van Zijl PCM, Yadav NN. Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST): what is in a name and what isn't? *Magn Reson Med*. 2011;65(4):927-948.
176. Zaiss M, Xu J, Goerke S, et al. Inverse Z -spectrum analysis for spillover-, MT-, and T_1 -corrected steady-state pulsed CEST-MRI - application to pH-weighted MRI of acute stroke: SIMPLE SPILLOVER-, MT-, AND T_1 -CORRECTED CEST-MRI. *NMR Biomed*. 2014;27(3):240-252.
177. Sun PZ. Quasi-steady-state CEST (QUASS CEST) solution improves the accuracy of CEST quantification: QUASS CEST MRI-based omega plot analysis. *Magn Reson Med*. 2021;86(2):765-776.
178. Sun PZ. Quasi-steady-state chemical exchange saturation transfer (QUASS CEST) MRI analysis enables T1 normalized CEST quantification - Insight into T1 contribution to CEST measurement. *J Magn Reson*. 2021;329:107022.
179. Sun PZ. Quasi-steady state chemical exchange saturation transfer (QUASS CEST) analysis-correction of the finite relaxation delay and saturation time for robust CEST measurement. *Magn Reson Med*. 2021;85(6):3281-3289.
180. Tietze A, Blicher J, Mikkelsen IK, et al. Assessment of ischemic penumbra in human hyperacute stroke patients using amide proton transfer (APT) Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) MRI. *NMR in biomedicine*. 2014;27(2):163.
181. Heo HY, Zhang Y, Jiang S, Lee DH, Zhou J. Quantitative Assessment of Amide Proton Transfer (APT) and Nuclear Overhauser Enhancement (NOE) Imaging with Extrapolated Semi-solid Magnetization Transfer Reference (EMR) Signals: II. Comparison of Three EMR Models and Application to Human Brain Glioma at 3 T. *Magnetic resonance in medicine*. 2016;75(4):1630.
182. Zhang L, Zhao Y, Chen Y, et al. Voxel-wise Optimization of Pseudo Voigt Profile (VOPVP) for Z-spectra fitting in chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI. *Quant Imaging Med Surg*. 2019;9(10):1714-1730.
183. Wu Y, Zhou IY, Lu D, et al. pH-sensitive amide proton transfer effect dominates the magnetization transfer asymmetry contrast during acute ischemia-quantification of multipool contribution to in vivo CEST MRI: Resolution of Multipool Contribution to In Vivo pH-Sensitive APT MRI. *Magn Reson Med*. 2018;79(3):1602-1608.
184. Woessner DE, Zhang S, Merritt ME, Sherry AD. Numerical solution of the Bloch equations provides insights into the optimum design of PARACEST agents for MRI. *Magn Reson Med*. 2005;53(4):790-799.

185. Zhou IY, Wang E, Cheung JS, Zhang X, Fulci G, Sun PZ. Quantitative chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI of glioma using Image Downsampling Expedited Adaptive Least-squares (IDEAL) fitting. *Sci Rep.* 2017;7(1):84.
186. Dou W, Lin CYE, Ding H, et al. Chemical exchange saturation transfer magnetic resonance imaging and its main and potential applications in pre-clinical and clinical studies. *Quant Imaging Med Surg.* 2019;9(10):1747-1766.
187. Zhou Y, van Zijl PCM, Xu X, et al. Magnetic resonance imaging of glycogen using its magnetic coupling with water. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117(6):3144-3149.
188. Song X, Airan RD, Arifin DR, et al. Label-free in vivo molecular imaging of underglycosylated mucin-1 expression in tumour cells. *Nat Commun.* 2015;6:6719.
189. Walker-Samuel S, Ramasawmy R, Torrealdea F, et al. In vivo imaging of glucose uptake and metabolism in tumors. *Nat Med.* 2013;19(8):1067-1072.
190. Chan KWY, McMahon MT, Kato Y, et al. Natural D-Glucose as a biodegradable MRI contrast agent for detecting cancer. *Magn Reson Med.* 2012;68(6):1764-1773.
191. Xu X, Chan KW, Knutsson L, et al. Dynamic Glucose Enhanced (DGE) MRI for Combined Imaging of Blood Brain Barrier Break Down and Increased Blood Volume in Brain Cancer. *Magn Reson Med.* 2015;74(6):1556-1563.
192. Xu X, Sehgal AA, Yadav NN, et al. d-glucose weighted chemical exchange saturation transfer (glucoCEST)-based dynamic glucose enhanced (DGE) MRI at 3T: early experience in healthy volunteers and brain tumor patients. *Magn Reson Med.* 2020;84(1):247-262.
193. Xu X, Yadav NN, Knutsson L, et al. Dynamic Glucose-Enhanced (DGE) MRI: Translation to Human Scanning and First Results in Glioma Patients. *Tomography.* 2015;1(2):105-114.
194. Wang J, Weygand J, Hwang KP, et al. Magnetic Resonance Imaging of Glucose Uptake and Metabolism in Patients with Head and Neck Cancer. *Sci Rep.* 2016;6:30618.
195. DeBrosse C, Nanga RPR, Bagga P, et al. Lactate Chemical Exchange Saturation Transfer (LATEST) imaging in vivo a biomarker for LDH activity. *Sci Rep.* 2016;6:19517.
196. Kl R, Db A, M F, et al. Chemical Exchange Saturation Transfer for Lactate-Weighted Imaging at 3 T MRI: Comprehensive In Silico, In Vitro, In Situ, and In Vivo Evaluations. *Tomography (Ann Arbor, Mich).* 2022;8(3).
197. Ling W, Regatte RR, Navon G, Jerschow A. Assessment of glycosaminoglycan concentration in vivo by chemical exchange-dependent saturation transfer (gagCEST). *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(7):2266-2270.
198. Krishnamoorthy G, Nanga RPR, Bagga P, Hariharan H, Reddy R. High quality 3D gagCEST imaging of in vivo human knee cartilage at 7T. *Magn Reson Med.* 2017;77(5):1866-1873.
199. Wada T, Togao O, Tokunaga C, et al. Glycosaminoglycan chemical exchange saturation transfer in human lumbar intervertebral discs: Effect of saturation pulse and relationship with low back pain. *J Magn Reson Imaging.* 2017;45(3):863-871.

200. Vohra R, Wang YN, Son H, et al. Non-Invasive Monitoring of Increased Fibrotic Tissue and Hyaluronan Deposition in the Tumor Microenvironment in the Advanced Stages of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)*. 2022;14(4):999.
201. Maloney E, Wang YN, Vohra R, et al. Magnetic resonance imaging biomarkers for pulsed focused ultrasound treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2020;26(9):904-917.
202. Jin T, Wang P, Hitchens TK, Kim SG. Enhancing sensitivity of pH-weighted MRI with combination of amide and guanidyl CEST. *Neuroimage*. 2017;157:341-350.
203. Boyd PS, Breitling J, Korzowski A, et al. Mapping intracellular pH in tumors using amide and guanidyl CEST-MRI at 9.4 T. *Magnetic Resonance in Medicine*. n/a(n/a).
204. Loi L, Zimmermann F, Goerke S, et al. Relaxation-compensated CEST (chemical exchange saturation transfer) imaging in breast cancer diagnostics at 7T. *Eur J Radiol*. 2020;129:109068.
205. Zhou Z, Nguyen C, Chen Y, et al. Optimized CEST cardiovascular magnetic resonance for assessment of metabolic activity in the heart. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2017;19(1):95.
206. Schur GM, Dunn J, Nguyen S, et al. In vivo assessment of OXPHOS capacity using 3 T CrCEST MRI in Friedreich's ataxia. *J Neurol*. 2022;269(5):2527-2538.
207. Wei L, Hong S, Yoon Y, et al. Early prediction of response to Vorinostat in an orthotopic rat glioma model: BIOMARKERS FOR VORINOSTAT RESPONSE. *NMR Biomed*. 2012;25(9):1104-1111.
208. Wang H, Wang L, Zhang H, et al. ¹H NMR-based metabolic profiling of human rectal cancer tissue. *Mol Cancer*. 2013;12(1):121.
209. Cai K, Tain RW, Zhou XJ, et al. Creatine CEST MRI for Differentiating Gliomas with Different Degrees of Aggressiveness. *Mol Imaging Biol*. 2017;19(2):225-232.
210. Cember ATJ, Nanga RPR, Reddy R. Glutamate weighted CEST (gluCEST) imaging for mapping neurometabolism: An update on the state of the art and emerging findings from in vivo applications. *NMR Biomed*. Published online May 31, 2022:e4780.
211. O'Grady KP, Dula AN, Lyttle BD, et al. Glutamate-sensitive imaging and evaluation of cognitive impairment in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2019;25(12):1580-1592.
212. Roalf DR, Nanga RPR, Rupert PE, et al. Glutamate imaging (GluCEST) reveals lower brain GluCEST contrast in patients on the psychosis spectrum. *Mol Psychiatry*. 2017;22(9):1298-1305.
213. Davis KA, Nanga RPR, Das S, et al. Glutamate Imaging (GluCEST) Lateralizes Epileptic Foci in Non-Lesional Temporal Lobe Epilepsy. *Sci Transl Med*. 2015;7(309):309ra161.
214. Neal A, Moffat BA, Stein JM, et al. Glutamate weighted imaging contrast in gliomas with 7 Tesla magnetic resonance imaging. *NeuroImage: Clinical*. 2019;22:101694.
215. Yi H, Talmon G, Wang J, et al. Glutamate in cancers: from metabolism to signaling: *The Journal of Biomedical Research*. 2020;{articleBase.volume}({articleBase.issue}):1.

216. Pacheco R, Oliva H, Martinez-Navío JM, et al. Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation. *J Immunol.* 2006;177(10):6695-6704.
217. Yao J, Hagiwara A, Raymond C, et al. Human IDH mutant 1p/19q co-deleted gliomas have low tumor acidity as evidenced by molecular MRI and PET: a retrospective study. *Sci Rep.* 2020;10:11922.
218. Mancini L, Casagrande S, Gautier G, et al. CEST MRI provides amide/amine surrogate biomarkers for treatment-naïve glioma sub-typing. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* Published online January 14, 2022.
219. Hagiwara A, Yao J, Raymond C, et al. "Aerobic glycolytic imaging" of human gliomas using combined pH-, oxygen-, and perfusion-weighted magnetic resonance imaging. *Neuroimage Clin.* 2021;32:102882.
220. Harris RJ, Cloughesy TF, Liao LM, et al. pH-weighted molecular imaging of gliomas using amine chemical exchange saturation transfer MRI. *Neuro-Oncology.* 2015;17(11):1514-1524.
221. Zhou J, Payen JF, Wilson DA, Traystman RJ, van Zijl PCM. Using the amide proton signals of intracellular proteins and peptides to detect pH effects in MRI. *Nat Med.* 2003;9(8):1085-1090.
222. Schüre J, Shrestha M, Breuer S, et al. The pH sensitivity of APT-CEST using phosphorus spectroscopy as a reference method. *NMR Biomed.* 2019;32(11):e4125.
223. Zhou J. Amide Proton Transfer Imaging of the Human Brain. *Methods Mol Biol.* 2011;711:227-237.
224. Yu L, Chen Y, Chen M, et al. Amide Proton Transfer MRI Signal as a Surrogate Biomarker of Ischemic Stroke Recovery in Patients With Supportive Treatment. *Front Neurol.* 2019;10:104.
225. Holmes HE, Colgan N, Ismail O, et al. Imaging the accumulation and suppression of tau pathology using multiparametric MRI. *Neurobiol Aging.* 2016;39:184-194.
226. Wells JA, O'Callaghan JM, Holmes HE, et al. In vivo imaging of tau pathology using multiparametric quantitative MRI. *Neuroimage.* 2015;111:369-378.
227. Zhou J, Lal B, Wilson DA, Laterra J, van Zijl PCM. Amide proton transfer (APT) contrast for imaging of brain tumors. *Magn Reson Med.* 2003;50(6):1120-1126.
228. Sun PZ, Zhou J, Sun W, Huang J, van Zijl PCM. Detection of the ischemic penumbra using pH-weighted MRI. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27(6):1129-1136.
229. Salhotra A, Lal B, Laterra J, Sun PZ, van Zijl PCM, Zhou J. Amide proton transfer imaging of 9L gliosarcoma and human glioblastoma xenografts. *NMR Biomed.* 2008;21(5):489-497.
230. Hobbs SK, Shi G, Homer R, Harsh G, Atlas SW, Bednarski MD. Magnetic resonance image-guided proteomics of human glioblastoma multiforme. *J Magn Reson Imaging.* 2003;18(5):530-536.
231. Yan K, Fu Z, Yang C, et al. Assessing Amide Proton Transfer (APT) MRI Contrast Origins in 9 L Gliosarcoma in the Rat Brain Using Proteomic Analysis. *Mol Imaging Biol.* 2015;17(4):479-487.
232. Togao O, Yoshiura T, Keupp J, et al. Amide proton transfer imaging of adult diffuse gliomas: correlation with histopathological grades. *Neuro Oncol.* 2014;16(3):441-448.

233. Jones CK, Schlosser MJ, van Zijl PCM, Pomper MG, Golay X, Zhou J. Amide proton transfer imaging of human brain tumors at 3T. *Magn Reson Med*. 2006;56(3):585-592.
234. Choi YS, Ahn SS, Lee SK, et al. Amide proton transfer imaging to discriminate between low- and high-grade gliomas: added value to apparent diffusion coefficient and relative cerebral blood volume. *Eur Radiol*. 2017;27(8):3181-3189.
235. Sakata A, Fushimi Y, Okada T, et al. Diagnostic performance between contrast enhancement, proton MR spectroscopy, and amide proton transfer imaging in patients with brain tumors. *J Magn Reson Imaging*. 2017;46(3):732-739.
236. Jiang S, Yu H, Wang X, et al. Molecular MRI differentiation between primary central nervous system lymphomas and high-grade gliomas using endogenous protein-based amide proton transfer MR imaging at 3 Tesla. *Eur Radiol*. 2016;26(1):64-71.
237. Yu H, Lou H, Zou T, et al. Applying protein-based amide proton transfer MR imaging to distinguish solitary brain metastases from glioblastoma. *Eur Radiol*. 2017;27(11):4516-4524.
238. Jiang S, Zou T, Eberhart CG, et al. Predicting IDH mutation status in grade-II gliomas using amide proton transfer-weighted (APT_w) MRI. *Magn Reson Med*. 2017;78(3):1100-1109.
239. Paech D, Windschuh J, Oberhollenzer J, et al. Assessing the predictability of IDH mutation and MGMT methylation status in glioma patients using relaxation-compensated multipool CEST MRI at 7.0 T. *Neuro Oncol*. 2018;20(12):1661-1671.
240. Ma B, Blakeley JO, Hong X, et al. Applying amide proton transfer-weighted MRI to distinguish pseudoprogression from true progression in malignant gliomas: APT-MRI of Pseudo- vs. True Progression. *J Magn Reson Imaging*. 2016;44(2):456-462.
241. Jiang S, Eberhart CG, Lim M, et al. Identifying Recurrent Malignant Glioma after Treatment Using Amide Proton Transfer-Weighted MR Imaging: A Validation Study with Image-Guided Stereotactic Biopsy. *Clin Cancer Res*. 2019;25(2):552-561.
242. Zhou J, Tryggstad E, Wen Z, et al. Differentiation between glioma and radiation necrosis using molecular magnetic resonance imaging of endogenous proteins and peptides. *Nat Med*. 2011;17(1):130-134.
243. Jia G, Abaza R, Williams JD, et al. Amide Proton Transfer MR Imaging of Prostate Cancer: A Preliminary Study. *J Magn Reson Imaging*. 2011;33(3):647-654.
244. Krikken E, Khlebnikov V, Zaiss M, et al. Amide chemical exchange saturation transfer at 7 T: a possible biomarker for detecting early response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2018;20:51.
245. Dula AN, Arlinghaus LR, Dortch RD, et al. Amide Proton Transfer Imaging of the Breast at 3 T: Establishing Reproducibility and Possible Feasibility Assessing Chemotherapy Response. *Magn Reson Med*. 2013;70(1):216-224.
246. Chen LQ, Howison CM, Jeffery JJ, Robey IF, Kuo PH, Pagel MD. Evaluations of extracellular pH within in vivo tumors using acidoCEST MRI. *Magn Reson Med*. 2014;72(5):1408-1417.

247. Longo DL, Dastrù W, Digilio G, et al. Iopamidol as a responsive MRI-chemical exchange saturation transfer contrast agent for pH mapping of kidneys: In vivo studies in mice at 7 T. *Magn Reson Med*. 2011;65(1):202-211.
248. Wu Y, Zhou IY, Igarashi T, Longo DL, Aime S, Sun PZ. A generalized ratiometric chemical exchange saturation transfer (CEST) MRI approach for mapping renal pH using iopamidol. *Magn Reson Med*. Published online July 7, 2017.
249. Jones KM, Randtke EA, Yoshimaru ES, et al. Clinical Translation of Tumor Acidosis Measurements with AcidoCEST MRI. *Mol Imaging Biol*. 2017;19(4):617-625.
250. Müller-Lutz A, Khalil N, Schmitt B, et al. Pilot study of Iopamidol-based quantitative pH imaging on a clinical 3T MR scanner. *MAGMA*. 2014;27(6):477-485.
251. Hu X, Xue M, Sun S, et al. Combined application of MRS and DWI can effectively predict cell proliferation and assess the grade of glioma: A prospective study. *J Clin Neurosci*. 2021;83:56-63.
252. Yuan Y, Zeng D, Liu Y, et al. DWI and IVIM are predictors of Ki67 proliferation index: direct comparison of MRI images and pathological slices in a murine model of rhabdomyosarcoma. *Eur Radiol*. 2020;30(3):1334-1341.
253. Rao A, Sharma C, Paramalli R. Role of diffusion-weighted MRI in differentiating benign from malignant bone tumors. *BJR Open*. 2019;1(1):20180048.
254. Yin P, Mao N, Liu X, et al. Can clinical radiomics nomogram based on 3D multiparametric MRI features and clinical characteristics estimate early recurrence of pelvic chondrosarcoma? *J Magn Reson Imaging*. 2020;51(2):435-445.
255. Müller U, Kubik-Huch RA, Ares C, et al. Is there a role for conventional MRI and MR diffusion-weighted imaging for distinction of skull base chordoma and chondrosarcoma? *Acta Radiol*. 2016;57(2):225-232.
256. Douis H, Jeys L, Grimer R, Vaiyapuri S, Davies AM. Is there a role for diffusion-weighted MRI (DWI) in the diagnosis of central cartilage tumors? *Skeletal Radiol*. 2015;44(7):963-969.
257. Jo I, Gould D, Schlicht S, Taubman K, Choong P. Diagnostic accuracy of functional imaging modalities for chondrosarcoma: A systematic review and meta-analysis. *J Bone Oncol*. 2019;19:100262.
258. Belouèche-Babari M, Chung YL, Al-Saffar NMS, Falck-Miniotis M, Leach MO. Metabolic assessment of the action of targeted cancer therapeutics using magnetic resonance spectroscopy. *Br J Cancer*. 2010;102(1):1-7.
259. Kurhanewicz J, Bok R, Nelson SJ, Vigneron DB. Current and Potential Applications of Clinical ¹³C MR Spectroscopy. *J Nucl Med*. 2008;49(3):341-344.
260. Glunde K, Jiang L, Moestue SA, Gribbestad IS. MRS and MRSI guidance in molecular medicine: targeting and monitoring of choline and glucose metabolism in cancer. *NMR Biomed*. 2011;24(6):673-690.
261. Cheng M, Glunde K. Magnetic Resonance Spectroscopy Studies of Mouse Models of Cancer. *Methods Mol Biol*. 2018;1718:331-345.

262. Nakagawa M, Yamaguchi M, Endo M, et al. Clinical usefulness of 2-hydroxyglutarate as a biomarker in IDH-mutant chondrosarcoma. *J Bone Oncol.* 2022;34:100430.
263. Fayad LM, Bluemke DA, McCarthy EF, Weber KL, Barker PB, Jacobs MA. Musculoskeletal tumors: Use of proton MR spectroscopic imaging for characterization. *Journal of Magnetic Resonance Imaging.* 2006;23(1):23-28.
264. Peyrode C, Weber V, Voissière A, et al. Proteoglycans as Target for an Innovative Therapeutic Approach in Chondrosarcoma: Preclinical Proof of Concept. *Mol Cancer Ther.* 2016;15(11):2575-2585.
265. Kim M, Eleftheriou A, Ravotto L, et al. What do we know about dynamic glucose-enhanced (DGE) MRI and how close is it to the clinics? Horizon 2020 GLINT consortium report. *MAGMA.* 2022;35(1):87-104.
266. Basu S, Hess S, Nielsen Braad PE, Olsen BB, Inglev S, Høilund-Carlsen PF. The Basic Principles of FDG-PET/CT Imaging. *PET Clin.* 2014;9(4):355-370, v.
267. Subhawong TK, Winn A, Shemesh SS, Pretell-Mazzini J. F-18 FDG PET differentiation of benign from malignant chondroid neoplasms: a systematic review of the literature. *Skeletal Radiol.* 2017;46(9):1233-1239.
268. Vadi SK, Mittal BR, Gorla AKR, et al. 18F-FDG PET/CT in Diagnostic and Prognostic Evaluation of Patients With Suspected Recurrence of Chondrosarcoma. *Clin Nucl Med.* 2018;43(2):87-93.
269. Zhang Q, Xi Y, Li D, Yuan Z, Dong J. The utility of 18F-FDG PET and PET/CT in the diagnosis and staging of chondrosarcoma: a meta-analysis. *J Orthop Surg Res.* 2020;15(1):229.
270. Perrin J, Capitaio M, Mougin-Degraef M, et al. Cell Tracking in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Medicine.* 2020;7.
271. Wei W, Rosenkrans ZT, Liu J, Huang G, Luo QY, Cai W. ImmunoPET: Concept, Design, and Applications. *Chem Rev.* 2020;120(8):3787-3851.
272. Bouleau A, Lebon V, Truillet C. PET imaging of immune checkpoint proteins in oncology. *Pharmacol Ther.* 2021;222:107786.
273. Ehlerding EB, Lee HJ, Jiang D, et al. Antibody and fragment-based PET imaging of CTLA-4+ T-cells in humanized mouse models. *Am J Cancer Res.* 2019;9(1):53-63.
274. Vento J, Mulgaonkar A, Woolford L, et al. PD-L1 detection using 89Zr-atezolizumab immuno-PET in renal cell carcinoma tumorgrafts from a patient with favorable nivolumab response. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):144.
275. Jeswani T, Padhani AR. Imaging tumour angiogenesis. *Cancer Imaging.* 2005;5(1):131-138.
276. De Coninck T, Jans L, Sys G, et al. Dynamic contrast-enhanced MR imaging for differentiation between enchondroma and chondrosarcoma. *Eur Radiol.* 2013;23(11):3140-3152.
277. Haubner R, Wester HJ, Reuning U, et al. Radiolabeled alpha(v)beta3 integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting. *J Nucl Med.* 1999;40(6):1061-1071.

278. Krishnaraju VS, Kumar R, Sood A, et al. Angiogenesis-Targeted 68Ga-DOTA-RGD2 PET/CT Imaging: a Potential Theranostic Application in the Case of Chondrosarcoma. *Nucl Med Mol Imaging*. 2021;55(3):141-145.
279. Dou S, Bai Y, Shandil A, et al. Detecting prostate cancer and prostatic calcifications using advanced magnetic resonance imaging. *Asian J Androl*. 2017;19(4):439-443.
280. Zulfiqar M, Dumrongpisutikul N, Intrapiomkul J, Yousem DM. Detection of Intratumoral Calcification in Oligodendrogliomas by Susceptibility-Weighted MR Imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2012;33(5):858-864.
281. O'Connor JPB, Robinson SP, Waterton JC. Imaging tumour hypoxia with oxygen-enhanced MRI and BOLD MRI. *Br J Radiol*. 2019;92(1096):20180642.
282. Salem A, Little RA, Latif A, et al. Oxygen-enhanced MRI Is Feasible, Repeatable, and Detects Radiotherapy-induced Change in Hypoxia in Xenograft Models and in Patients with Non-small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2019;25(13):3818-3829.
283. Little RA, Jamin Y, Boulton JKR, et al. Mapping Hypoxia in Renal Carcinoma with Oxygen-enhanced MRI: Comparison with Intrinsic Susceptibility MRI and Pathology. *Radiology*. 2018;288(3):739-747.
284. Saito S, Takahashi Y, Ohki A, Shintani Y, Higuchi T. Early detection of elevated lactate levels in a mitochondrial disease model using chemical exchange saturation transfer (CEST) and magnetic resonance spectroscopy (MRS) at 7T-MRI. *Radiol Phys Technol*. 2019;12(1):46-54.
285. Yao J, Pang Tan CH, Schlossman J, et al. pH-weighted amine chemical exchange saturation transfer echoplanar imaging (CEST-EPI) as a potential early biomarker for bevacizumab failure in recurrent glioblastoma. *J Neurooncol*. 2019;142(3):587-595.
286. McVicar N, Li AX, Meakin SO, Bartha R. Imaging chemical exchange saturation transfer (CEST) effects following tumor-selective acidification using lonidamine. *NMR Biomed*. 2015;28(5):566-575.
287. Albatany M, Li A, Meakin S, Bartha R. In vivo detection of acute intracellular acidification in glioblastoma multiforme following a single dose of cariporide. *Int J Clin Oncol*. 2018;23(5):812-819.
288. Albatany M, Li A, Meakin S, Bartha R. Dichloroacetate induced intracellular acidification in glioblastoma: in vivo detection using AACID-CEST MRI at 9.4 Tesla. *J Neurooncol*. 2018;136(2):255-262.
289. Marathe K, McVicar N, Li A, Bellyou M, Meakin S, Bartha R. Topiramate induces acute intracellular acidification in glioblastoma. *J Neurooncol*. 2016;130(3):465-472.
290. Albatany M, Meakin S, Bartha R. Brain pH Measurement Using AACID CEST MRI Incorporating the 2 ppm Amine Resonance. *Tomography*. 2022;8(2):730-739.
291. Lombardi AF, Wong JH, High R, et al. AcidoCEST MRI Evaluates the Bone Microenvironment in Multiple Myeloma. *Mol Imaging Biol*. 2021;23(6):865-873.

292. Goldenberg JM, Cárdenas-Rodríguez J, Pagel MD. Preliminary Results that Assess Metformin Treatment in a Preclinical Model of Pancreatic Cancer Using Simultaneous [18F]FDG PET and acidoCEST MRI. *Mol Imaging Biol.* 2018;20(4):575-583.
293. High RA, Randtke EA, Jones KM, et al. Extracellular acidosis differentiates pancreatitis and pancreatic cancer in mouse models using acidoCEST MRI. *Neoplasia.* 2019;21(11):1085-1090.
294. Lindeman LR, Jones KM, High RA, Howison CM, Shubit LF, Pagel MD. Differentiating lung cancer and infection based on measurements of extracellular pH with acidoCEST MRI. *Sci Rep.* 2019;9(1):13002.
295. Carles M, Fechter T, Grosu AL, et al. 18F-FMISO-PET Hypoxia Monitoring for Head-and-Neck Cancer Patients: Radiomics Analyses Predict the Outcome of Chemo-Radiotherapy. *Cancers (Basel).* 2021;13(14):3449.
296. Thureau S, Piton N, Gouel P, et al. First Comparison between [18f]-FMISO and [18f]-Faza for Preoperative Pet Imaging of Hypoxia in Lung Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(16):4101.
297. Carmona-Bozo JC, Manavaki R, Woitek R, et al. Hypoxia and perfusion in breast cancer: simultaneous assessment using PET/MR imaging. *Eur Radiol.* 2021;31(1):333-344.
298. Puri T, Greenhalgh TA, Wilson JM, et al. [18F]Fluoromisonidazole PET in rectal cancer. *EJNMMI Res.* 2017;7(1):78.
299. Sanduleanu S, Wiel AMA van der, Lieveise RIY, et al. Hypoxia PET Imaging with [18F]-HX4-A Promising Next-Generation Tracer. *Cancers (Basel).* 2020;12(5):E1322.
300. Liu T, Karlsen M, Karlberg AM, Redalen KR. Hypoxia imaging and theranostic potential of [64Cu][Cu(ATSM)] and ionic Cu(II) salts: a review of current evidence and discussion of the retention mechanisms. *EJNMMI Res.* 2020;10:33.
301. Mapelli P, Callea M, Fallanca F, et al. 18F-FAZA PET/CT in pretreatment assessment of hypoxic status in high-grade glioma: correlation with hypoxia immunohistochemical biomarkers. *Nucl Med Commun.* 2021;42(7):763-771.
302. Lopci E, Grizzi F, Russo C, et al. Early and delayed evaluation of solid tumours with 64Cu-ATSM PET/CT: a pilot study on semiquantitative and computer-aided fractal geometry analysis. *Nucl Med Commun.* 2017;38(4):340-346.
303. Lewis JS, Laforest R, Dehdashti F, Grigsby PW, Welch MJ, Siegel BA. An imaging comparison of 64Cu-ATSM and 60Cu-ATSM in cancer of the uterine cervix. *J Nucl Med.* 2008;49(7):1177-1182.
304. Pérès EA, Toutain J, Paty LP, et al. 64Cu-ATSM/64Cu-Cl2 and their relationship to hypoxia in glioblastoma: a preclinical study. *EJNMMI Res.* 2019;9(1):114.
305. Carlin S, Zhang H, Reese M, Ramos NN, Chen Q, Ricketts SA. A comparison of the imaging characteristics and microregional distribution of 4 hypoxia PET tracers. *J Nucl Med.* 2014;55(3):515-521.
306. Kudo T, Ueda M, Kuge Y, et al. Imaging of HIF-1-Active Tumor Hypoxia Using a Protein Effectively Delivered to and Specifically Stabilized in HIF-1-Active Tumor Cells. *J Nucl Med.* 2009;50(6):942-949.

307. Ueda M, Ogawa K, Miyano A, Ono M, Kizaka-Kondoh S, Saji H. Development of an Oxygen-Sensitive Degradable Peptide Probe for the Imaging of Hypoxia-Inducible Factor-1-Active Regions in Tumors. *Mol Imaging Biol.* 2013;15(6):713-721.
308. Lau J, Lin KS, Bénard F. Past, Present, and Future: Development of Theranostic Agents Targeting Carbonic Anhydrase IX. *Theranostics.* 2017;7(17):4322-4339.
309. Divgi CR, Uzzo RG, Gatsonis C, et al. Positron Emission Tomography/Computed Tomography Identification of Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Results From the REDECT Trial. *JCO.* 2013;31(2):187-194.
310. Muselaers CHJ, Boerman OC, Oosterwijk E, Langenhuijsen JF, Oyen WJG, Mulders PFA. Indium-111-labeled Girentuximab ImmunoSPECT as a Diagnostic Tool in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *European Urology.* 2013;63(6):1101-1106.
311. Huizing FJ, Hoeben BAW, Franssen GM, Boerman OC, Heskamp S, Bussink J. Quantitative Imaging of the Hypoxia-Related Marker CAIX in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Xenograft Models. *Mol Pharm.* 2019;16(2):701-708.
312. Guan SS, Cheng CC, Ho AS, et al. Sulfonamide derivative targeting carbonic anhydrase IX as a nuclear imaging probe for colorectal cancer detection *in vivo*. *Oncotarget.* 2015;6(34):36139-36155.
313. Lau J, Zhang Z, Jenni S, et al. PET Imaging of Carbonic Anhydrase IX Expression of HT-29 Tumor Xenograft Mice with ⁶⁸ Ga-Labeled Benzenesulfonamides. *Mol Pharmaceutics.* 2016;13(3):1137-1146.
314. Iikuni S, Okada Y, Shimizu Y, Watanabe H, Ono M. Synthesis and evaluation of indium-111-labeled imidazothiadiazole sulfonamide derivative for single photon emission computed tomography imaging targeting carbonic anhydrase-IX. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2020;30(14):127255.
315. Garousi J, Honarvar H, Andersson KG, et al. Comparative Evaluation of Affibody Molecules for Radionuclide Imaging of *in Vivo* Expression of Carbonic Anhydrase IX. *Mol Pharmaceutics.* 2016;13(11):3676-3687.
316. Garousi J, Huizing FJ, Vorobyeva A, et al. Comparative evaluation of affibody- and antibody fragments-based CAIX imaging probes in mice bearing renal cell carcinoma xenografts. *Sci Rep.* 2019;9(1):14907.
317. Demoin DW, Wyatt LC, Edwards KJ, et al. PET Imaging of Extracellular pH in Tumors with ⁶⁴ Cu- and ¹⁸ F-Labeled pHIP Peptides: A Structure–Activity Optimization Study. *Bioconjugate Chem.* 2016;27(9):2014-2023.
318. Hatcher CC, Collins AT, Kim SY, et al. Relationship between T1rho magnetic resonance imaging, synovial fluid biomarkers, and the biochemical and biomechanical properties of cartilage. *J Biomech.* 2017;55:18-26.
319. Collins AT, Hatcher CC, Kim SY, et al. Selective Enzymatic Digestion of Proteoglycans and Collagens Alters Cartilage T1rho and T2 Relaxation Times. *Ann Biomed Eng.* 2019;47(1):190-201.

320. Williams AA, Titchenal MR, Do BH, Guha A, Chu CR. MRI UTE-T2* shows high incidence of cartilage subsurface matrix changes 2 years after ACL reconstruction. *J Orthop Res.* 2019;37(2):370-377.
321. Martín Noguerol T, Raya JG, Wessell DE, Vilanova JC, Rossi I, Luna A. Functional MRI for evaluation of hyaline cartilage extracellular matrix, a physiopathological-based approach. *Br J Radiol.* 2019;92(1103):20190443.
322. Eder J, Szomolanyi P, Schmid-Schwab M, et al. Early diagnosis of degenerative changes in the articular/fibrocartilaginous disc of the temporomandibular joint in patients with temporomandibular disorders using delayed gadolinium-enhanced MRI at 3 Tesla - preliminary results. *Magn Reson Imaging.* 2020;67:24-27.
323. Vidal A, Gaumet V, Galmier MJ, et al. Development of a freeze-dried kit formulation for the preparation of 99m Tc-NTP 15-5, a radiotracer for scintigraphic imaging of proteoglycans. *Appl Radiat Isot.* 2015;101:1-9.
324. Peyrode C, Weber V, David E, et al. Quaternary ammonium-melphalan conjugate for anticancer therapy of chondrosarcoma: in vitro and in vivo preclinical studies. *Invest New Drugs.* 2012;30(4):1782-1790.
325. Miot-Noirault E, David E, Vidal A, et al. 99mTc-NTP 15-5 assessment of the early therapeutic response of chondrosarcoma to zoledronic acid in the Swarm rat orthotopic model. *EJNMMI Res.* 2013;3(1):40.
326. Miot-Noirault E, Gouin F, Vidal A, et al. First preclinical imaging of primary cartilage neoplasm and its local recurrence using 99mTc-NTP 15-5 radiotracer. *J Nucl Med.* 2009;50(9):1541-1547.
327. Johnson JD, Rainer WG, Rose PS, Houdek MT. Utility of Bone Scintigraphy and PET-CT in the Surgical Staging of Skeletal Chondrosarcoma. *Anticancer Research.* 2020;40(10):5735-5738.
328. Choi WH, Han EJ, Chang KB, Joo MW. Quantitative SPECT/CT for differentiating between enchondroma and grade I chondrosarcoma. *Sci Rep.* 2020;10(1):10587.
329. Liu Y, Sheng J, Dong Z, et al. The diagnostic performance of 18F-fluoride PET/CT in bone metastases detection: a meta-analysis. *Clin Radiol.* 2019;74(3):196-206.
330. Jackson T, Mosci C, von Eyben R, et al. Combined 18F-NaF and 18F-FDG PET/CT in the Evaluation of Sarcoma Patients. *Clin Nucl Med.* 2015;40(9):720-724.
331. Yang X, Zhu G, Yang Z, Zeng K, Liu F, Sun J. Expression of PD-L1/PD-L2 is associated with high proliferation index of Ki-67 but not with TP53 overexpression in chondrosarcoma. *Int J Biol Markers.* 2018;33(4):507-513.
332. Tawbi HA, Burgess M, Bolejack V, et al. Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(11):1493-1501.
333. Bilusic M, Heery CR, Collins JM, et al. Phase I trial of HuMax-IL8 (BMS-986253), an anti-IL-8 monoclonal antibody, in patients with metastatic or unresectable solid tumors. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):240.

334. Paoluzzi L, Cacavio A, Ghesani M, et al. Response to anti-PD1 therapy with nivolumab in metastatic sarcomas. *Clin Sarcoma Res.* 2016;6:24.
335. Lee HP, Lin CY, Shih JS, et al. Adiponectin promotes VEGF-A-dependent angiogenesis in human chondrosarcoma through PI3K, Akt, mTOR, and HIF- α pathway. *Oncotarget.* 2015;6(34):36746-36761.
336. Liu GT, Chen HT, Tsou HK, et al. CCL5 promotes VEGF-dependent angiogenesis by down-regulating miR-200b through PI3K/Akt signaling pathway in human chondrosarcoma cells. *Oncotarget.* 2014;5(21):10718-10731.
337. Sun X, Charbonneau C, Wei L, Yang W, Chen Q, Terek RM. CXCR4-targeted therapy inhibits VEGF expression and chondrosarcoma angiogenesis and metastasis. *Mol Cancer Ther.* 2013;12(7):1163-1170.
338. Klenke FM, Abdollahi A, Bertl E, et al. Tyrosine kinase inhibitor SU6668 represses chondrosarcoma growth via antiangiogenesis in vivo. *BMC Cancer.* 2007;7:49.
339. Li S. Anlotinib: A Novel Targeted Drug for Bone and Soft Tissue Sarcoma. *Front Oncol.* 2021;11:664853.
340. Fallah J, Rini BI. HIF Inhibitors: Status of Current Clinical Development. *Curr Oncol Rep.* 2019;21(1):6.
341. Krasner CN, Campos SM, Young CL, et al. Sequential Phase II clinical trials evaluating CRLX101 as monotherapy and in combination with bevacizumab in recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2021;162(3):661-666.
342. Jeong W, Rapisarda A, Park SR, et al. Pilot trial of EZN-2968, an antisense oligonucleotide inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α), in patients with refractory solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;73(2):343-348.
343. Palayoor ST, Mitchell JB, Cerna D, Degraff W, John-Aryankalayil M, Coleman CN. PX-478, an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1alpha, enhances radiosensitivity of prostate carcinoma cells. *Int J Cancer.* 2008;123(10):2430-2437.
344. Kulke MH, Chan JA, Meyerhardt JA, et al. A prospective phase II study of 2-methoxyestradiol administered in combination with bevacizumab in patients with metastatic carcinoid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68(2):293-300.
345. Zhang C, Yang C, Feldman MJ, et al. Vorinostat suppresses hypoxia signaling by modulating nuclear translocation of hypoxia inducible factor 1 alpha. *Oncotarget.* 2017;8(34):56110-56125.
346. Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist.* 2007;12(10):1247-1252.
347. Courtney KD, Infante JR, Lam ET, et al. Phase I Dose-Escalation Trial of PT2385, a First-in-Class Hypoxia-Inducible Factor-2 α Antagonist in Patients With Previously Treated Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol.* 2018;36(9):867-874.
348. Jonasch E, Donskov F, Iliopoulos O, et al. Belzutifan for Renal Cell Carcinoma in von Hippel-Lindau Disease. *N Engl J Med.* 2021;385(22):2036-2046.

349. Choueiri TK, Bauer TM, Papadopoulos KP, et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor-2 α in renal cell carcinoma with belzutifan: a phase 1 trial and biomarker analysis. *Nat Med*. 2021;27(5):802-805.
350. Xu R, Wang K, Rizzi JP, et al. 3-[(1S,2S,3R)-2,3-Difluoro-1-hydroxy-7-methylsulfonylindan-4-yl]oxy-5-fluorobenzonitrile (PT2977), a Hypoxia-Inducible Factor 2 α (HIF-2 α) Inhibitor for the Treatment of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Med Chem*. 2019;62(15):6876-6893.
351. Ward C, Meehan J, Mullen P, et al. Evaluation of carbonic anhydrase IX as a therapeutic target for inhibition of breast cancer invasion and metastasis using a series of in vitro breast cancer models. *Oncotarget*. 2015;6(28):24856-24870.
352. Nerella SG, Singh P, Arifuddin M, Supuran CT. Anticancer carbonic anhydrase inhibitors: a patent and literature update 2018-2022. *Expert Opin Ther Pat*. Published online May 26, 2022.
353. Andreucci E, Ruzzolini J, Peppicelli S, et al. The carbonic anhydrase IX inhibitor SLC-0111 sensitises cancer cells to conventional chemotherapy. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2018;34(1):117-123.
354. McDonald PC, Chia S, Bedard PL, et al. A Phase 1 Study of SLC-0111, a Novel Inhibitor of Carbonic Anhydrase IX, in Patients With Advanced Solid Tumors. *Am J Clin Oncol*. 2020;43(7):484-490.
355. Lara PN, Frankel P, Mack PC, et al. Tirapazamine plus carboplatin and paclitaxel in advanced malignant solid tumors: a california cancer consortium phase I and molecular correlative study. *Clin Cancer Res*. 2003;9(12):4356-4362.
356. Covens A, Blessing J, Bender D, Mannel R, Morgan M, Gynecologic Oncology Group. A phase II evaluation of tirapazamine plus cisplatin in the treatment of recurrent platinum-sensitive ovarian or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2006;100(3):586-590.
357. Williamson SK, Crowley JJ, Lara PN, et al. Phase III trial of paclitaxel plus carboplatin with or without tirapazamine in advanced non-small-cell lung cancer: Southwest Oncology Group Trial S0003. *J Clin Oncol*. 2005;23(36):9097-9104.
358. Rischin D, Peters LJ, O'Sullivan B, et al. Tirapazamine, cisplatin, and radiation versus cisplatin and radiation for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (TROG 02.02, HeadSTART): a phase III trial of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2010;28(18):2989-2995.
359. DiSilvestro PA, Ali S, Craighead PS, et al. Phase III randomized trial of weekly cisplatin and irradiation versus cisplatin and tirapazamine and irradiation in stages IB2, IIA, IIB, IIIB, and IVA cervical carcinoma limited to the pelvis: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 2014;32(5):458-464.
360. Ghatage P, Sabagh H. Is there a role for tirapazamine in the treatment of cervical cancer? *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2012;8(12):1589-1597.
361. Hicks KO, Pruijn FB, Sturman JR, Denny WA, Wilson WR. Multicellular resistance to tirapazamine is due to restricted extravascular transport: a pharmacokinetic/pharmacodynamic study in HT29 multicellular layer cultures. *Cancer Res*. 2003;63(18):5970-5977.

362. Anderson RF, Yadav P, Patel D, et al. Characterisation of radicals formed by the triazine 1,4-dioxide hypoxia-activated prodrug, SN30000. *Org Biomol Chem*. 2014;12(21):3386-3392.
363. Mehibel M, Singh S, Chinje EC, Cowen RL, Stratford IJ. Effects of cytokine-induced macrophages on the response of tumor cells to banoxantrone (AQ4N). *Mol Cancer Ther*. 2009;8(5):1261-1269.
364. Albertella MR, Loadman PM, Jones PH, et al. Hypoxia-selective targeting by the bioreductive prodrug AQ4N in patients with solid tumors: results of a phase I study. *Clin Cancer Res*. 2008;14(4):1096-1104.
365. Papadopoulos KP, Goel S, Beeram M, et al. A phase 1 open-label, accelerated dose-escalation study of the hypoxia-activated prodrug AQ4N in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res*. 2008;14(21):7110-7115.
366. Steward WP, Middleton M, Benghiat A, et al. The use of pharmacokinetic and pharmacodynamic end points to determine the dose of AQ4N, a novel hypoxic cell cytotoxin, given with fractionated radiotherapy in a phase I study. *Ann Oncol*. 2007;18(6):1098-1103.
367. Patterson AV, Ferry DM, Edmunds SJ, et al. Mechanism of action and preclinical antitumor activity of the novel hypoxia-activated DNA cross-linking agent PR-104. *Clin Cancer Res*. 2007;13(13):3922-3932.
368. McKeage MJ, Gu Y, Wilson WR, et al. A phase I trial of PR-104, a pre-prodrug of the bioreductive prodrug PR-104A, given weekly to solid tumour patients. *BMC Cancer*. 2011;11:432.
369. McKeage MJ, Jameson MB, Ramanathan RK, et al. PR-104 a bioreductive pre-prodrug combined with gemcitabine or docetaxel in a phase Ib study of patients with advanced solid tumours. *BMC Cancer*. 2012;12:496.
370. Konopleva M, Thall PF, Yi CA, et al. Phase I/II study of the hypoxia-activated prodrug PR104 in refractory/relapsed acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015;100(7):927-934.
371. Duan JX, Jiao H, Kaizerman J, et al. Potent and highly selective hypoxia-activated achiral phosphoramidate mustards as anticancer drugs. *J Med Chem*. 2008;51(8):2412-2420.
372. Li Y, Zhao L, Li XF. The Hypoxia-Activated Prodrug TH-302: Exploiting Hypoxia in Cancer Therapy. *Front Pharmacol*. 2021;12:636892.
373. Meng F, Evans JW, Bhupathi D, et al. Molecular and Cellular Pharmacology of the Hypoxia-Activated Prodrug TH-302. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2012;11(3):740-751.
374. Sun JD, Liu Q, Wang J, et al. Selective Tumor Hypoxia Targeting by Hypoxia-Activated Prodrug TH-302 Inhibits Tumor Growth in Preclinical Models of Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(3):758-770.
375. Liapis V, Labrinidis A, Zinonos I, et al. Hypoxia-activated pro-drug TH-302 exhibits potent tumor suppressive activity and cooperates with chemotherapy against osteosarcoma. *Cancer Lett*. 2015;357(1):160-169.
376. Voissiere A, Jouberton E, Maubert E, et al. Development and characterization of a human three-dimensional chondrosarcoma culture for in vitro drug testing. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181340.

377. Liapis V, Zysk A, DeNichilo M, et al. Anticancer efficacy of the hypoxia-activated prodrug evofosfamide is enhanced in combination with proapoptotic receptor agonists against osteosarcoma. *Cancer Med.* 2017;6(9):2164-2176.
378. Saggar JK, Tannock IF. Chemotherapy Rescues Hypoxic Tumor Cells and Induces Their Reoxygenation and Repopulation—An Effect That Is Inhibited by the Hypoxia-Activated Prodrug TH-302. *Clinical Cancer Research.* 2015;21(9):2107-2114.
379. Jayaprakash P, Ai M, Liu A, et al. Targeted hypoxia reduction restores T cell infiltration and sensitizes prostate cancer to immunotherapy. *J Clin Invest.* 2018;128(11):5137-5149.
380. Jamieson SM, Tsai P, Kondratyev MK, et al. Evofosfamide for the treatment of human papillomavirus-negative head and neck squamous cell carcinoma. *JCI Insight.* 2018;3(16):122204.
381. Chawla SP, Cranmer LD, Van Tine BA, et al. Phase II study of the safety and antitumor activity of the hypoxia-activated prodrug TH-302 in combination with doxorubicin in patients with advanced soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol.* 2014;32(29):3299-3306.
382. Borad MJ, Reddy SG, Bahary N, et al. Randomized Phase II Trial of Gemcitabine Plus TH-302 Versus Gemcitabine in Patients With Advanced Pancreatic Cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(13):1475-1481.
383. Brenner A, Zuniga R, Sun JD, et al. Hypoxia-activated evofosfamide for treatment of recurrent bevacizumab-refractory glioblastoma: a phase I surgical study. *Neuro Oncol.* 2018;20(9):1231-1239.
384. Tap WD, Papai Z, Van Tine BA, et al. Doxorubicin plus evofosfamide versus doxorubicin alone in locally advanced, unresectable or metastatic soft-tissue sarcoma (TH CR-406/SARC021): an international, multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(8):1089-1103.
385. Badar T, Handisides DR, Benito JM, et al. Phase I study of evofosfamide, an investigational hypoxia-activated prodrug, in patients with advanced leukemia. *Am J Hematol.* 2016;91(8):800-805.
386. Spiegelberg L, Houben R, Niemans R, et al. Hypoxia-activated prodrugs and (lack of) clinical progress: The need for hypoxia-based biomarker patient selection in phase III clinical trials. *Clin Transl Radiat Oncol.* 2019;15:62-69.
387. Anderson RF, Li D, Hunter FW. Antagonism in effectiveness of evofosfamide and doxorubicin through intermolecular electron transfer. *Free Radic Biol Med.* 2017;113:564-570.
388. Higgins JP, Sarapa N, Kim J, Poma E. Unexpected pharmacokinetics of evofosfamide observed in phase III MAESTRO study. *JCO.* 2018;36(15_suppl):2568-2568.
389. Raeeszadeh-Sarmazdeh M, Do LD, Hritz BG. Metalloproteinases and Their Inhibitors: Potential for the Development of New Therapeutics. *Cells.* 2020;9(5):E1313.
390. Liu Y, Li ZH, Zhang L, Lu SB. ADAM8 promotes chondrosarcoma cell migration and invasion by activating the NF- κ B/MMP-13 signaling axis. *Anticancer Drugs.* 2019;30(7):e0790.

391. Tzeng HE, Tang CH, Wu SH, et al. CCN6-mediated MMP-9 activation enhances metastatic potential of human chondrosarcoma. *Cell Death Dis.* 2018;9(10):955.
392. Tayeh M, Watanapokasin R. Antimetastatic Potential of Rhodomyrtone on Human Chondrosarcoma SW1353 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020;2020:8180261.
393. Xu W, Wan Q, Na S, Yokota H, Yan JL, Hamamura K. Suppressed invasive and migratory behaviors of SW1353 chondrosarcoma cells through the regulation of Src, Rac1 GTPase, and MMP13. *Cell Signal.* 2015;27(12):2332-2342.
394. Song J, Zhu J, Zhao Q, Tian B. Gefitinib causes growth arrest and inhibition of metastasis in human chondrosarcoma cells. *J BUON.* 2015;20(3):894-901.
395. Higuchi T, Takeuchi A, Munesue S, et al. Anti-tumor effects of a nonsteroidal anti-inflammatory drug zaltoprofen on chondrosarcoma via activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma and suppressing matrix metalloproteinase-2 expression. *Cancer Med.* 2018;7(5):1944-1954.
396. Miladi I, Vivier M, Dauplat MM, et al. Doxycycline and its quaternary ammonium derivative for adjuvant therapies of chondrosarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;80(3):517-526.
397. Bonomi P. Matrix metalloproteinases and matrix metalloproteinase inhibitors in lung cancer. *Semin Oncol.* 2002;29(1 Suppl 4):78-86.
398. Otero JE, Stevens JW, Malandra AE, et al. Osteoclast inhibition impairs chondrosarcoma growth and bone destruction. *J Orthop Res.* 2014;32(12):1562-1571.
399. Gouin F, Ory B, Rédini F, Heymann D. Zoledronic acid slows down rat primary chondrosarcoma development, recurrent tumor progression after intralesional curettage and increases overall survival. *International Journal of Cancer.* 2006;119(5):980-984.
400. Montella L, Addeo R, Faiola V, et al. Zoledronic acid in metastatic chondrosarcoma and advanced sacrum chordoma: two case reports. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009;28(1).
401. Streitbueger A, Henrichs M, Ahrens H, et al. Cytotoxic effect of clodronate and zoledronate on the chondrosarcoma cell lines HTB-94 and CAL-78. *International Orthopaedics.* 2011;35(9):1369-1373.
402. Morcuende JA, Stevens JW, Scheetz TE, et al. Swarm Rat Chondrosarcoma Cells as an in vivo model: Lung Colonization and Effects of Tissue Environment on Tumor Growth. *Iowa Orthop J.* 2012;32:46-53.
403. Peyrode C, Gouin F, Vidal A, et al. A "Proteoglycan targeting strategy" for the scintigraphic imaging and monitoring of the swarm rat chondrosarcoma orthotopic model. *Sarcoma.* 2011;2011.
404. Li T, Deng P. Nuclear Magnetic Resonance technique in tumor metabolism. *Genes & Diseases.* 2017;4(1):28-36.
405. Xu Z, Li XF, Zou H, Sun X, Shen B. 18F-Fluoromisonidazole in tumor hypoxia imaging. *Oncotarget.* 2017;8(55):94969-94979.

406. Clark DJ, Smith AK, Dortch RD, Knopp MV, Smith SA. Investigating hydroxyl chemical exchange using a variable saturation power chemical exchange saturation transfer (vCEST) method at 3 T: Investigating Hydroxyl Chemical Exchange Using vCEST. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2016;76(3):826-837.
407. Moon BF, Jones KM, Chen LQ, et al. A comparison of iopromide and iopamidol, two acidoCEST MRI contrast media that measure tumor extracellular pH. *Contrast Media Mol Imaging*. 2015;10(6):446-455.
408. Villano D, Romdhane F, Irrera P, et al. A fast multislice sequence for 3D MRI-CEST pH imaging. *Magn Reson Med*. 2021;85(3):1335-1349.
409. Gallez B. The Role of Imaging Biomarkers to Guide Pharmacological Interventions Targeting Tumor Hypoxia. *Front Pharmacol*. 2022;13:853568.
410. Lapi SE, Lewis JS, Dehdashti F. Evaluation of Hypoxia With Copper-Labeled Diacetyl-bis(N-Methylthiosemicarbazone). *Seminars in Nuclear Medicine*. 2015;45(2):177-185.
411. Soellner ST, Welsch GH, Gelse K, et al. gagCEST imaging at 3 T MRI in patients with articular cartilage lesions of the knee and intraoperative validation. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2021;29(8):1163-1172.
412. Tang Y, Xiao G, Shen Z, et al. Noninvasive Detection of Extracellular pH in Human Benign and Malignant Liver Tumors Using CEST MRI. *Front Oncol*. 2020;10:578985.

RÉSUMÉ

Le microenvironnement tumoral regroupe différentes composantes très souvent impliquées dans le phénomène de résistance à la thérapie pour de nombreux cancers. Une meilleure caractérisation de ce microenvironnement, à l'aide d'une stratégie d'imagerie moléculaire et fonctionnelle *in vivo*, permettrait une meilleure stratification des patients et donc une prise en charge thérapeutique optimale et personnalisée.

Cette étude a porté sur le microenvironnement tumoral du chondrosarcome, tumeur maligne du cartilage chimio- et radio-résistante, possédant une matrice extracellulaire dense, riche en glycosaminoglycanes (constituants des protéoglycanes), et qui présente des zones d'hypoxie.

La première partie de ce travail de thèse a consisté à développer un contraste en IRM métabolique dépendant de la fréquence spectrale. Il devait être spatialement résolu et non invasif afin de caractériser les deux aspects du microenvironnement tumoral du chondrosarcome SWARM implanté en sous-cutané chez la souris. Le contraste choisi a été celui du transfert de saturation par échange chimique CEST (chemical exchange saturation transfer). Les résultats obtenus en IRM CEST ont été comparés à (i) ceux d'imagerie nucléaire, en [^{99m}Tc]NTP 15-5 et en [¹⁸F]FMISO, permettant de cibler respectivement, les charges négatives des glycosaminoglycanes et l'hypoxie et (ii) ceux obtenus par différentes approches *ex vivo*. Ces méthodes complémentaires d'imageries moléculaires et fonctionnelles *in vivo* ont permis de visualiser le microenvironnement tumoral à un stade défini de la pathologie

La seconde partie de ce travail a été d'évaluer la pertinence de cette stratégie d'imagerie multimodale, pour suivre l'évolution et les remaniements du microenvironnement tumoral d'un chondrosarcome SWARM implanté en orthotopique chez le rat, au cours d'une thérapie anti-cancéreuse ciblée. Une prodrogue activable en hypoxie, le TH-302 (évofofosamide) a été sélectionné. L'approche multimodale, décrite dans le paragraphe précédent, complétée par d'autres analyses, a permis de montrer la pertinence d'une stratégie d'imagerie utilisant plusieurs modalités pour évaluer l'efficacité du TH-302. Une réduction du volume tumoral d'environ 75%, mais aussi des diminutions du métabolisme glucidique et de la fraction hypoxique ont pu être observées, ainsi que des modifications de la matrice extracellulaire au cours de la croissance tumorale.

Mots clés : Chondrosarcome, CEST, Hypoxie, Imagerie multimodale fonctionnelle, Imagerie nucléaire, IRM, Matrice extracellulaire, Microenvironnement tumoral, Prodrogues activables en hypoxie, Protéoglycanes.