



**HAL**  
open science

# Identification de nouvelles voies de signalisation activées dans les léiomyosarcomes

Hiba El Sayadi

► **To cite this version:**

Hiba El Sayadi. Identification de nouvelles voies de signalisation activées dans les léiomyosarcomes. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10326 . tel-00877434

**HAL Id: tel-00877434**

**<https://theses.hal.science/tel-00877434>**

Submitted on 28 Oct 2013

**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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 23 Décembre 2009

par

Mademoiselle Hiba EL SAYADI

**Identification de nouvelles voies de signalisation  
activées dans les léiomyosarcomes**

Directeur de thèse : Pr. Jean-Yves BLAY

JURY : Pr Sylvie Négrier, Président  
Pr Jean-Michel COINDRE, Rapporteur  
Pr Christophe BORG, Rapporteur  
Pr Jean-Yves BLAY, Directeur de thèse

# *Remerciements*

Je tiens tout d'abord à remercier les Prs Jean-Michel Coindre et Christophe Borg qui me font l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs. Sachez mon profond respect et ma sensibilité à votre disponibilité et vos conseils. Je remercie également le Pr Charles Dumontet qui m'a fait l'honneur de présider le jury de thèse.

Mes remerciements iront tout naturellement à toi, Jean-Yves, UN GRAND MERCI A TOI, de m'avoir fait confiance pour la réalisation de cette thèse et de m'avoir aidée, encouragée, et soutenue tout au long de ce travail. Merci pour tes conseils, et ta disponibilité sans limite ; même à distance, t'étais toujours disponible pour répondre à mes nombreuses questions... Merci de m'avoir fait partager, avec générosité, tes connaissances et ta motivation. J'ai beaucoup appris sous ta direction, et je t'en remercie.

Je tiens également à te remercier Christophe, pour ta disponibilité, tes conseils et suggestions, et pour toutes nos discussions scientifiques.

Merci à Séverine, de m'avoir chaleureusement accueillie, à mon arrivée au laboratoire ; de m'avoir aidée et encouragée dans mes premiers moments de doute. Merci de m'avoir transmis ton expérience, et ton savoir-faire. Merci pour ton amitié.

Merci à l'équipe « sarcomes », Laurent, Daniel, Angélique, Anthony, Martine, Adeline (Duc), Jennifer, Aurélie, Thomas. Merci pour votre soutien et votre bonne humeur.

Angélique, merci pour tes réponses à mes questions, pour ton aide et ton soutien.

Merci à Daniel pour son implication sur le projet et pour m'avoir fait découvrir le monde passionnant des « microarrays » !

Martine, Adeline (Duc), Cathy, Dominique, Anne-Claire, merci beaucoup pour votre écoute, vos encouragements, et votre aide. Merci pour tous les agréables moments passés ensemble.

Martine, une grande pensée pour toi, pour toute ton aide, notamment dans ma recherche et visites d'appartements !

Christine, (même si tu penses toujours que je plante les ordinateurs), je te remercie pour ton écoute et tes conseils. Merci à Nathalie, Jenny, Isabelle (Puisieux) et Colette.

Merci à Estitou, Sarounette, Michael et Marine, pour leur soutien et bonne humeur.

Isabelle (Durand), merci pour ta relecture de mon introduction, pour ton soutien pendant les moments de stress durant la rédaction, et pour ta bonne humeur.

Petite Isa, « Flo Flo », Vanja, Nadège, Julien, Linda, et Adeline (Mansuy) (pour toutes les soirées « rédactions/pizzas » qu'on a passées ensemble), merci pour tous vos encouragements et votre amitié.

Merci à mes copines, Zeina, Doudou, Ghuna, Rouma, Souha et Loulou, et Reina, pour tous les bons moments passés ensemble... merci pour votre amitié !

Un énorme merci à mes parents, et mes frères, pour m'avoir soutenue avec affection depuis toujours. Malgré les kilomètres qui nous séparent, vous aviez toujours été là pour moi ! Je ne serais jamais arrivée jusqu'à ce moment sans vous, MERCI.

Et pour finir, je n'aurais jamais autant de mots pour te remercier Baha'a, de m'avoir aidée à aller au bout de cette histoire, et de m'avoir supportée et encouragée durant toute cette période.

# Table des matières

Préambule.....	3
Introduction.....	4
I- Les sarcomes des tissus mous (STM) et des viscères.....	4
1.1 Classification histologique.....	4
1.2 Classification moléculaire.....	5
1.3 La prise en charge des sarcomes : diagnostic, chirurgie, traitements médicaux.....	8
1.3.1 Diagnostic:.....	8
1.3.2 Prise en charge thérapeutique :.....	8
1.4 Les thérapeutiques ciblées des sarcomes.....	9
1.4.1 GIST et Imatinib : le modèle de thérapeutique ciblée pour une tumeur solide...	10
1.4.2 Dermatofibrosarcome protuberans.....	10
1.4.3 Le rôle de l'imatinib dans le traitement des synovites villonodulaires pigmentées ou tumeurs tenosynoviales à cellules géantes.....	11
1.4.4 Ciblage de HER1 dans les sarcomes synoviaux et les tumeurs des gaines nerveuses périphériques (MPNST).....	11
1.4.5 Utilisation de l'IGF1R dans les sarcomes d'Ewing et les autres sarcomes.....	12
1.4.6 Ciblage de CDK4 MDM2 dans les liposarcomes.....	12
1.4.7 Antagonistes des estrogènes et imatinib dans les tumeurs desmoides.....	13
II- Les Léiomyosarcomes.....	14
2.1 Définition :.....	14
2.2 Epidémiologie :.....	14
2.3 Caractéristiques cliniques :.....	15
2.4 Histologie :.....	15
2.5 Localisation des léiomyosarcomes.....	15
2.6 Génétique des léiomyosarcomes:.....	16
2.6.1 CGH Array.....	16
2.6.2 Corrélation génotype/histologie.....	17
2.6.3 Profils d'expression génique dans les LMS.....	18
2.6.4 Altérations moléculaires :.....	19
III- La famille des récepteurs tyrosine kinases (RTKs).....	22
3.1 Structure et mécanisme d'activation des RTKs:.....	24
3.2 Les voies de transduction du signal des RTKs.....	24
3.3 La régulation négative de la signalisation des RTKs.....	26
3.3.1 Au niveau du ligand :.....	27
3.3.2 Au niveau du domaine kinase du récepteur :.....	27
3.3.3 Les protéines inhibitrices de la cascade de signalisation :.....	28
3.3.4 L'ubiquitination et la dégradation du récepteur induite par le ligand :.....	29
3.4 Les interactions entre les RTKs et les autres récepteurs membranaires.....	30
3.4.1. Interactions avec les RCPGs.....	30
3.4.2 Interaction avec les intégrines et les kinases intracellulaires qui leur sont associées.....	32
3.4.3 Interaction entre deux RTKs de différentes familles.....	34
IV- Les récepteurs tyrosine kinases activés dans les sarcomes.....	35
4.1 Les facteurs de transcription anormaux induisent l'expression de récepteurs et de ligands.....	35
4.2 Récepteurs et ligands : parfois des partenaires dans les produits de translocations...	36
4.3 RTK mutés : l'exemple des tumeurs stromales gastrointestinales (GIST).....	37

V- La famille des récepteurs TAM (Tyro-3, Axl et Mer) .....	38
5.1. Profil d'expression des récepteurs TAM.....	40
5.2 Deux ligands : Gas6 et la protéine S .....	40
5.3 Fonctions cellulaires des récepteurs TAM .....	43
5.3.1 Phagocytose des cellules en apoptose .....	43
5.3.2 Fonction des TAM sur les plaquettes sanguines .....	44
5.3.3 Système nerveux central.....	45
5.3.4 Spermatogenèse.....	45
5.3.5 Cellules musculaires lisses des vaisseaux .....	45
5.4 Implication des récepteurs TAM en oncologie .....	46
5.4.1 Mer : .....	46
5.4.2 Axl : .....	47
5.4.3 Tyro-3 :.....	47
5.5 Rôle des récepteurs TAM dans les différents mécanismes de l'oncogénèse .....	47
5.5.1 La migration et l'invasion tissulaire.....	48
5.5.2 L'angiogenèse .....	48
5.5.3 La survie cellulaire et la croissance tumorale .....	50
5.6 Interaction Axl Tyro 3 .....	51
Objectifs de notre travail de thèse .....	51
Résultats .....	53
Article 1 : (en cours de soumission).....	54
Protein expression profile in leiomyosarcomas: a potential autocrine role for Tyro3 and Gas6.....	54
Article 2 publié :.....	79
Kit mutations induce intracellular retention and activation of an immature form of the KIT protein in Gastro-Intestinal Stromal Tumors (GISTs) .....	79
Article 3 publié:.....	82
Complete response to imatinib in relapsing pigmented villonodular synovitis/tenosynovial giant cell tumor (PVNS/TGCT). .....	82
Discussion .....	84
Annexes .....	102
Références .....	103

# Préambule

L'objectif de notre travail de thèse est d'identifier des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire tumorale, et d'analyser leur fonction, et leurs mécanismes d'activation. Nos modèles d'études sont les sarcomes, une famille de tumeurs mésoenchymateuses rares d'origine mésodermique, qui représentent environ 1 à 2 % de l'ensemble des tumeurs malignes des tissus conjonctifs (Clark et al., 2005) et pour lesquelles les progrès dans la caractérisation des anomalies moléculaires causales ont permis le développement de plusieurs thérapeutiques ciblées in vivo chez le patient atteint de cancer.

Les anomalies moléculaires récurrentes de sous types de sarcomes guident la classification nosologique et désormais le traitement de ces tumeurs, notamment le choix de la chimiothérapie cytotoxique et surtout le développement des thérapeutiques ciblées. Cependant, environ 50% des sarcomes ne présentent pas d'anomalies moléculaires caractéristiques mais des altérations cytogénétiques complexes, avec pertes et gains multiples de segments chromosomiques. Les léiomyosarcomes, les sarcomes pléomorphes et les fibrohistiocytomes malins (MFH) rentrent dans ce sous-groupe.

L'objectif de notre travail était d'identifier des cibles moléculaires potentielles pour les thérapeutiques ciblées dans ces sarcomes, en nous focalisant sur les léiomyosarcomes. Nous avons entrepris cette exploration par une approche protéomique, en sélectionnant les cibles ainsi identifiées sur des tumeurs fraîches, pour une analyse fonctionnelle sur des lignées de même histologie.

Dans notre introduction bibliographique, nous présentons l'état des connaissances sur ces tumeurs, en mettant l'accent sur l'entité nosologique léiomyosarcome, afin de poser le problème, avant d'exposer l'état des connaissances sur les récepteurs tyrosine kinases que nous avons identifiés lors de notre travail de thèse, notamment sur la famille des récepteurs TAM, particulièrement Tyro-3.

# Introduction

## I- Les sarcomes des tissus mous (STM) et des viscères

### 1.1 Classification histologique

Les sarcomes des tissus mous constituent un ensemble de maladies hétérogènes sur les plans histologique, cytologique et moléculaire. Contrairement aux cancers épithéliaux, qui se développent dans des organes spécifiques, les sarcomes peuvent apparaître dans tous les endroits du corps sous la forme d'un tissu mou différencié adipeux, fibreux, musculaire lisse ou strié. Dérivés de tissus d'origine mésodermique, plus rarement ectodermique, les STM sont généralement classés selon les tissus auxquels ils ressemblent : on parle ainsi de léiomyosarcomes lorsque les cellules tumorales ont des caractéristiques cytologiques et phénotypiques proches de celles des cellules musculaires lisses normales.

L'incidence annuelle des sarcomes, tous sites confondus, est mal connue, mais les chiffres habituellement proposés sont certainement en deçà de la réalité. On estime qu'entre 5 et 7 nouveaux cas pour 100 000 habitants sont diagnostiqués chaque année, dont  $\frac{3}{4}$  sont des sarcomes des tissus mous (STM) et des viscères.

Il existe plus de 50 sous-types histopathologiques de sarcomes de tissus mous (Christopher D.M, word health classification of tumour, 2002). Le tableau 1 présente les principaux types histologiques à l'intérieur desquels existent des sous-types caractérisés par des anomalies génétiques et une histoire naturelle parfois totalement différente. Le concept de la classification des sarcomes des tissus mous (STS), introduit pour la première fois par Russel *et al.* en 1977 (Russell et al., 1977), constitue le facteur le plus important de leur classification clinico-pathologique. Les deux paramètres les plus importants sont l'index mitotique et l'étendue de la nécrose tumorale (Trojani et al., 1984), (van Unnik et al., 1993).

Le principal élément pronostique dans l'histologie des STM est le grade histopronostique. Plusieurs classifications ont été proposées. La classification française, en 3 grades, est la plus généralement utilisée (Coindre et al., 2001). Elle est basée sur l'index mitotique, la présence de nécrose et la différenciation cellulaire. Cette classification a une valeur pronostique pour le risque de rechute locale, métastatique et le risque de décès. Les patients porteurs de tumeurs



de grade 1, 2 et 3 ont une espérance de vie à 5 ans voisine de 95%, 75% et 45 % respectivement (Coindre et al., 1996). La classification histologique des sarcomes est en constante évolution : certaines entités telles que les fibrohistiocytes malins (MFH), qui représentaient un des principaux sous-types histologiques dans les grandes séries, sont actuellement en démembrement et seront probablement reclassés dans les autres sous-types histologiques sur la base de nouveaux marqueurs phénotypiques en immunohistochimie ou d'anomalies moléculaires spécifiques de sous-types histologiques. Certaines entités telles que les léiomyosarcomes du tube digestif ont été reclassées en tumeurs des progéniteurs des cellules de Cajal, ou tumeurs stromales gastro intestinales (GIST), caractérisées par l'expression du récepteur tyrosine kinase c-kit. Il est probable que de nouvelles entités anatomopathologiques et moléculaires émergeront avec la généralisation des nouvelles techniques de biologie moléculaire (Nielsen et al., 2002).

**Tableau 1: Principaux sous types de sarcomes des parties molles adultes (Coindre et al., 1996)**

Type histologique	%
Fibrosarcome ou MFH	43%
Liposarcomes	13%
Synovialosarcomes	9%
Léiomyosarcomes	8%
Rhabdomyosarcomes	5%
Neurosarcomes	4%
Inclassables	5%
Autres (inclassables)	9%

## 1.2 Classification moléculaire

Les sarcomes des tissus mous présentent des anomalies moléculaires récurrentes entre les sous-types histologiques, et parfois spécifiques de sous types histologiques. Ces anomalies portent sur les gènes p53 et Rb, ainsi que sur les gènes qui contrôlent l'entrée dans le cycle cellulaire, notamment le passage au point de restriction de fin de phase G1 du cycle cellulaire : sont notamment affectés les gènes codant pour les cyclines (amplification de cycline D), les kinases dépendantes des cyclines (cdk2), ou les protéines inhibitrices des

kinases dépendantes des cyclines (p16). Les mutations de p53, Rb, cycline D ont une valeur pronostique dans certains sous types histologiques.

D'autres anomalies moléculaires sont spécifiques de sous types histologiques (PS Meltzer, Enzinger and Weiss 's Soft Tissue Tumors – 4th ed. St Louis MO, USA, Mosby. 2001). Six sous-types de tumeurs conjonctives ont ainsi été identifiés, en fonction des anomalies moléculaires rencontrées :

1) translocations spécifiques aboutissant à la constitution de gènes de fusion codant des modulateurs de transcription ou des protéines qui agissent comme des facteurs de croissance (EWS/Flil dans le sarcome d'Ewing, PDGF-COL1A1 dans le dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand -DFSP) (Prieur et al., 2004); (McArthur et al., 2005). Les principales translocations sont décrites dans le tableau 2.

**Tableau 2 : Translocations observées dans les sarcomes**

Sarcome	Translocation	Gene (fusion)	Incidence (%)
Ewing/PNET	t(11;22)(q24;q12)	<i>EWS-FLII</i>	85
	t(21;22)(q22;q12)	<i>EWS-ERG</i>	10
	t(7;22)(p22;q12)	<i>EWS-ETVI</i>	Rare
	t(17;22)(q12;q12)	<i>EWS-EIAF</i>	Rare
	t(2;22)(q33;q12)	<i>EWS-FEV</i>	Rare
DSRCT	t(11;22)(p13;q12)	<i>EWS-WTI</i>	95
Liposarcomes myxoïdes	t(12;16)(q13;p11)	<i>TLS-CHOP</i>	95
	t(12;22)(q13;q12)	<i>EWS-CHOP</i>	5
Chondrosarcomes extrasquelettiques myxoïdes	t(9;22)(q22;q12)		
Mélanome malin des tissus Mous (sarcomes à cellules claires)	t(12;22)(q13;q12)	<i>EWS-ATF1</i>	NK
Sarcomas synoviaux	t(X;18)(p11.23;q11)	<i>SYT-SSX1</i>	65

	t(X;18)(p11.21;q11)	<i>SYT-SSX2</i>	35
Rhabdomyosarcomes			
alvéolaires	t(2;13)(q35;q14)	<i>PAX3-FKHR</i>	75
	t(1;13)(p36;q14)	<i>PAX7-FKHR</i>	10
Dermatofibrosarcomes	t(17;22)(q22;q13)	<i>COL1A1-PDGFB</i>	NK

---

Ces translocations peuvent désormais être détectées par des techniques de biologie moléculaire de type PCR sur les échantillons cliniques et constituent un outil essentiel de diagnostic à l'heure actuelle.

2) Anomalies moléculaires touchant des gènes codant des cytokines ou des récepteurs tyrosine kinase de ces cytokines : mutations touchant les récepteurs tyrosine kinases (KIT et PDGFRA dans les GIST) (Hirota et al., 1998) (Heinrich et al., 2003b). Les tumeurs stromales gastro-intestinales sont ainsi caractérisées par de fréquentes mutations du gène *KIT*, le récepteur du stem cell factor (SCF), qui confèrent à la tyrosine kinase une activation constitutionnelle essentielle dans le processus d'oncogenèse pour ces tumeurs.

3) Délétion de gènes suppresseurs de tumeur (NF1 impliqué dans la neurofibromatose de type 1 ou INI1 dans les tumeurs rhabdoïdes)(Korf, 2001; Rousseau-Merck et al., 2005).

4) altérations génétiques simples (amplification de *mdm2/cdk4* dans les liposarcomes bien différenciés ou dédifférenciés) (Italiano et al., 2007; Sirvent et al., 2007)

5) altérations génétiques plus grossières (comme dans le cas du léiomyosarcome) (Levy et al., 2000; Otano-Joos et al., 2000)

6) altération des voies de l'adhésion cellulaire (délétion du gène *APC* ou mutation de la  $\beta$ -caténine dans les fibromatoses agressives) (Domont J, *ASCO Meeting Abstracts* 2008; (Jilong et al., 2007).

## **1.3 La prise en charge des sarcomes : diagnostic, chirurgie, traitements médicaux**

### **1.3.1 Diagnostic:**

La rareté de ces tumeurs, qui représentent approximativement 1% des cancers de l'adulte, ainsi que la variété des présentations cliniques rendent difficile la gestion et le diagnostic des cas.

Le diagnostic des sarcomes est généralement basé sur l'étude histopathologique et, dans certains cas, sur les techniques d'immunohistochimie et de diagnostic moléculaire. La biopsie est une étape essentielle de la prise en charge du patient. Elle doit faire l'objet d'un avis spécialisé pour toute tumeur de plus de 5 cm des tissus mous dont l'étiologie n'est pas évidente. Elle doit être réalisée par le chirurgien qui effectuera l'exérèse radicale, selon une incision dans l'axe du membre, de petite taille, en prévoyant la résection de la cicatrice lors du geste chirurgical secondaire. Les prélèvements doivent être confiés à l'anatomo-pathologiste, qui prévoira des techniques particulières de conservation pour des études de biologie moléculaire. Dans certains cas, sur des indications bien sélectionnées par une équipe entraînée, un prélèvement biopsique sous repérage échographique ou tomodensitométrique peut être envisagé.

### **1.3.2 Prise en charge thérapeutique :**

Le traitement standard des STM associe la chirurgie et la radiothérapie adjuvante (Morgan JA, *Eur.J Cancer.Suppl.* 2006 ; Wagner AJ, *ASCO Meeting Abstracts* 2008). Sauf dans le cas du sarcome d'Ewing des parties molles ou des rhabdomyosarcomes alvéolaires ou embryonnaires des tissus mous, la chimiothérapie adjuvante n'a pas apporté à ce jour de bénéfice thérapeutique tangible sur la survie. Les résultats d'une importante méta-analyse ont montré une amélioration de la survie sans progression locale ou à distance chez les patients traités par chimiothérapie adjuvante, mais sans bénéfice significatif en ce qui concerne la survie globale (Dematteo RP, *ASCO Meeting Abstracts* 2007). Une étude récente conduite par le Groupe Sarcomes italien a montré une amélioration significative de la survie globale chez les patients porteurs de sarcomes des extrémités à haut risque recevant une chimiothérapie adjuvante à base d'ifosfamide (Casali et al., 2008). Cependant, ce bénéfice de survie globale n'a pas été retrouvé à long terme. Les variations individuelles du risque de rechute, le respect

de la dose intensité ou d'autres facteurs qui restent à déterminer peuvent expliquer ces différences. La plus grande étude de chimiothérapie adjuvante par doxorubicine-ifosfamide dans les STM, conduite en 2007 par le groupe Sarcomes de l'EORTC (EORTC STBSG) et présentée à l'ASCO en 2007 et 2008, n'a pas mis en évidence de bénéfice significatif (Yang et al., 1998).

Chez les patients métastatiques, une chimiothérapie combinée comprenant la doxorubicine reste le traitement standard dans la plupart des sous-types histologiques, même si des taux de réponses de seulement 25 à 35% ont été obtenus dans la plupart des séries, avec une médiane de survie sans progression de 6 mois et une médiane de survie globale de 12 mois (Pisters et al., 1996) (Woll PJ, *ASCO Meeting Abstracts* 2007). Ces données ont peu ou pas évolué depuis vingt ans. La plupart des combinaisons ont présenté une toxicité trop importante pour les patients sans, le plus souvent, augmenter significativement le taux de survie par rapport à la doxorubicine utilisée seule. Par ailleurs, quel que soit le protocole utilisé, un petit nombre de patients de stade avancé survivent à long terme ; la proportion atteint 20% chez les patients en réponse complète après traitement de première ligne, mais seulement 3 à 4% chez ceux qui présentent au mieux, une réponse partielle ou une stabilisation de la maladie (Antman et al., 1993). Les sarcomes de stade avancé doivent par conséquent être considérés comme curables, même si le nombre de patients effectivement guéris en 2008 reste modeste.

Il reste par conséquent de nombreux progrès à faire dans la prise en charge des sarcomes des tissus mous ; les traitements les plus novateurs concernent actuellement les formes métastatiques. Cependant, il faut garder à l'esprit que les premières étapes de la prise en charge, lorsque la maladie est encore localisée, sont cruciales pour prévenir les rechutes et améliorer la survie des patients. Pour les sarcomes opérables, l'amélioration de la prise en charge passe par une modification de la stratégie thérapeutique et l'intervention d'équipes pluridisciplinaires dans des centres spécialisés (Edmonson et al., 1993; Helman and Meltzer, 2003; van Glabbeke et al., 1999).

## **1.4 Les thérapeutiques ciblées des sarcomes**

L'évolution des connaissances en matière de biologie des sarcomes a permis le développement de traitements spécifiques adaptés à chaque sous-type histologique. A ce jour, et sans surprise, la mise en évidence d'une anomalie moléculaire activatrice – ou récurrente – dans un sous-

type histologique donné s'est montrée bien plus efficace pour l'élaboration d'un traitement que la simple expression d'un marqueur spécifique (Blay et al., 2005b).

#### **1.4.1 GIST et Imatinib : le modèle de thérapie ciblée pour une tumeur solide**

Les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) sont des sarcomes d'individualisation récente, auparavant classés dans les léiomyosarcomes du tube digestif. Ces tumeurs ont un phénotype particulier, exprimant CD34 dans 72% des cas et c-kit, CD117, la tyrosine kinase récepteur du stem cell factor dans 95% des cas. Dans cette tumeur, les gènes KIT (75%) ou PDGFRA (5%) sont le siège de mutations activatrices probablement responsables de la transformation tumorale dans la majorité des GIST.

Ces sarcomes sont uniformément résistants aux chimiothérapies cytotoxiques. Depuis 2001, il a été démontré que le STI571 ou imatinib (Glivec®), un inhibiteur de c-abl, bcr-abl, c-kit et du récepteur du PDGF utilisé dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques était capable d'induire un taux de non progression à un an voisin de 80% dans cette affection (Blay et al., 2005a). Il s'agit d'un premier modèle de thérapie ciblée sur l'anomalie moléculaire causale dans une tumeur solide (Blay et al., 2005a). Ce médicament est actuellement étudié en situation adjuvante dans le cadre d'une étude intergroupe EORTC/GSF-GETO/FFCD. En octobre 2006, le sunitinib a obtenu une indication de deuxième ligne pour les patients porteurs de GIST avancés en échappement post Imatinib.

#### **1.4.2 Dermatofibrosarcome protuberans**

Le dermatofibrosarcome protuberans de Darier-Ferrand (DFSP) est un sarcome cutané rare à évolution lente et essentiellement locale (McArthur et al., 2005). Il est caractérisé par une translocation juxtaposant le gène du coll1A1 et le gène du PDGFa, produisant ainsi une protéine de fusion exprimée en excès dans les cellules tumorales et agissant comme facteur de croissance autocrine (McArthur et al., 2005). Plusieurs études rétrospectives ou prospectives basées sur l'activité inhibitrice de l'imatinib sur le PDGFRA ont été conduites. Elles ont démontré une activité antitumorale significative de l'imatinib dans cette pathologie, aussi bien dans les formes localisées ou localement avancées que dans les formes métastatiques (McArthur et al., 2005) (Maki et al., 2002). Après deux essais de phase II conduits par

l'EORTC (62027) et le SARC, l'efficacité de l'imatinib a été reconnue dans cette indication. Il est à noter qu'aucun autre agent n'avait jusque là été testé prospectivement ni n'avait démontré d'efficacité dans ces tumeurs rares.

### **1.4.3 Le rôle de l'imatinib dans le traitement des synovites villonodulaires pigmentées ou tumeurs tenosynoviales à cellules géantes**

La synovite villonodulaire pigmentée (SNVP), appelée également tumeur tenosynoviale à cellules géantes (TTCG), est une maladie rare qui se caractérise par une prolifération cellulaire se développant aux dépens de la synoviale et qui concerne essentiellement les jeunes adultes. Elle a longtemps été considérée comme un phénomène inflammatoire mais des observations récentes ont montré qu'il s'agissait en fait d'une tumeur bénigne associée à des altérations génétiques spécifiques (West et al., 2006). Une partie des cellules tumorales de SNVP/TTCG présentent une translocation t(1;2) spécifique impliquant le gène du collagène 6A3 et le gène M-CSF (CSF1) (sur le chromosome 1p13). Ce gène de fusion, exprimé par une partie des cellules, code une protéine de fusion qui cible les cellules non néoplasiques, M-CSFR, de façon paracrine. Le traitement des SNVP/TTCG repose généralement exclusivement sur la chirurgie. Cependant, en cas de rechute, une nouvelle intervention peut être nécessaire, ce qui risque d'entraîner des séquelles fonctionnelles importantes. En plus de son activité inhibitrice de BCR-ABL, KIT et PDGFRA, il a récemment été montré que l'imatinib utilisé à doses thérapeutiques, permettait de bloquer l'activation de M-CSFR (Dewar et al., 2005). L'imatinib a donc été testé en traitement de seconde ligne chez un patient porteur de SNVP/TTCG en rechute après chirurgie. Le patient a présenté une rémission complète, mais des études plus approfondies seront nécessaires pour confirmer l'activité de l'imatinib dans cette indication (Blay et al., 2008).

### **1.4.4 Ciblage de HER1 dans les sarcomes synoviaux et les tumeurs des gaines nerveuses périphériques (MPNST)**

L'analyse du profil d'expression génique et l'analyse par « microarrays » ont montré que plusieurs sous-types histologiques de sarcomes, en particulier les sarcomes synoviaux et les tumeurs des gaines nerveuses périphériques, exprimaient fortement EGFR (Nagayama et al., 2002). Deux études de phase II ont été conduites dans les STM avancés avec des inhibiteurs de tyrosine kinase : gefitinib dans les sarcomes synoviaux et erlotinib dans les tumeurs des

gaines nerveuses périphériques. Aucun des deux traitements n'a montré d'efficacité dans ces indications (Ray-Coquard et al., 2008) (Albritton KH, *ASCO Meeting Abstracts* 2006). Cela montre bien qu'il n'existe pas, dans ce modèle, de corrélation systématique entre expression de la cible et rôle de cette cible dans la progression tumorale. Une seule étude a rapporté l'expression de HER2 dans les sarcomes synoviaux et a montré une corrélation entre surexpression de la protéine et amélioration du pronostic, contrairement aux observations rapportées dans le cancer du sein (Nuciforo et al., 2003). Un essai clinique testant l'efficacité du trastuzumab seul dans les sarcomes synoviaux de stade avancé ou métastatique est en cours (étude SWOG-S0346).

#### **1.4.5 Utilisation de l'IGF1R dans les sarcomes d'Ewing et les autres sarcomes**

Des gènes de fusion codant pour des facteurs transcriptionnels impliqués dans la régulation du gène IGFBP3 ont été identifiés dans les sarcomes d'Ewing. L'expression d'IGFBP3 est inhibée par la protéine de fusion. Le gène est impliqué dans la régulation du système IGF1/IGF1R. Les facteurs de croissance « insuline-like » (IGF) et leurs récepteurs (IGFR) sont des facteurs de croissance qui jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus métaboliques et dans la prolifération cellulaire. Par son interaction avec l'IGF1 et le gène recombinant, IGFBP3 inhibe la prolifération des cellules et favorise l'apoptose dans les lignées de sarcome d'Ewing (Prieur et al., 2004). Sur la base de ces données biologiques, des essais de phase I et II utilisant un anticorps IGF1R ont été initiés. Les résultats préliminaires montrent que le traitement permet d'obtenir un contrôle tumoral chez 40 à 50% des patients réfractaires (Olmos D, *ASCO Meeting Abstracts* 2008; Atzori F, *ASCO Meeting Abstracts* 2008). Bien que cette tumeur soit très rare (3 à 5 cas par million et par an), plusieurs essais cliniques sont en cours.

#### **1.4.6 Ciblage de CDK4 MDM2 dans les liposarcomes**

Dans la même optique, l'amplification constante du gène *mdm2* et celle, plus occasionnelle, de *CDK4* dans les liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés suggère un intérêt thérapeutique potentiel des inhibiteurs de la protéine dans cette indication (Italiano et al., 2007; Sirvent et al., 2007). Des inhibiteurs de *CDK4* ont été testés dans des études de phase I, mais aucune activité antitumorale n'a été montrée à ce jour (Soni et al., 2000). Des études de



phase I utilisant des inhibiteurs de mdm2 (les nutlines) ont également été initiées (Vassilev et al., 2004). Il serait également intéressant d'analyser dans ces modèles les altérations moléculaires secondaires du gène JUN récemment décrites (Mariani et al., 2007).

#### **1.4.7 Antagonistes des estrogènes et imatinib dans les tumeurs desmoides**

Les tumeurs desmoides sont des tumeurs invasives développées à partir des fibroblastes et des myofibroblastes. Elles sont associées à un taux de récurrence locale ou locorégionale significatif, mais le risque de métastase est le plus souvent nul (Phillips et al., 2004; Posner et al., 1989). La caractérisation biologique de ces tumeurs n'a été effectuée que très récemment et les traitements ont donc été le plus souvent basés sur des données empiriques avec des niveaux de preuve limités. Les tumeurs desmoides présentent des altérations moléculaires caractéristiques de la voie APC- $\beta$  caténine. La  $\beta$ -caténine apparaît mutée dans plus de 85% des fibromatoses desmoides, tandis qu'un sous-groupe de tumeurs desmoides intra-abdominales est associé à la mutation du gène APC chez les patients porteurs du syndrome de Gardner (Domont J, *ASCO Meeting Abstracts* 2008; (Jilong et al., 2007). Initialement considérées comme des sarcomes de bas grade, la plupart de ces tumeurs peuvent évoluer très lentement ou même présenter des régressions spontanées. Par conséquent les traitements proposés dans la littérature sont très disparates (Janinis et al., 2003; Lanari, 1983). Cependant, un certain nombre de tumeurs finissent par progresser et entraîner la mort des patients, en particulier les tumeurs abdominales (jusqu'à 30%) et, quoique moins fréquemment, celles qui apparaissent au niveau des membres (10%) (Bonvalot et al., 2008; Merchant et al., 1999). Plusieurs traitements systémiques ont démontré une activité antitumorale dans cette indication : les AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens), les traitements hormonaux, les cytotoxiques utilisés à doses faibles ou standard, ou encore l'imatinib. Bien que reconnue depuis longtemps (Janinis et al., 2003; Lanari, 1983), l'activité des anti-estrogènes reste toutefois difficilement explicable au niveau moléculaire. Il a récemment été montré que les tumeurs desmoides exprimaient fortement le récepteur des estrogènes ER $\beta$  mais pas ER $\alpha$  (Deyrup et al., 2006). De la même manière, l'imatinib a démontré une activité antitumorale significative et les résultats de deux essais cliniques ont montré des taux de réponse de 15% et des taux de survie sans progression de 40 et 65% (Heinrich et al., 2006) (Penel N, *ASCO Meeting Abstracts* 2006). Les mécanismes biologiques régulant l'activité antitumorale de l'imatinib dans les tumeurs desmoides restent inexplicables. Des études sont en cours. Les

premiers essais utilisant l'imatinib étaient fondés sur l'identification d'une surexpression de KIT dans les cellules tumorales (due cependant à un possible artéfact lors de l'extraction de l'antigène). Une survie sans progression prolongée a été observée chez certains patients préalablement progressifs. Le traitement devra faire l'objet d'un essai randomisé afin d'établir la preuve de son activité antitumorale.

L'ensemble de ces modèles montre bien l'importance de la compréhension biologique de la maladie pour le développement efficace de thérapeutiques ciblées dans ces tumeurs. Afin d'éviter les écueils observés dans les synoviosarcomes et les tumeurs desmoïdes, nous nous sommes donc attachés à identifier une (des) cible(s) clé(s) de la prolifération tumorale dans les léiomyosarcomes. Nous décrivons ci-après plus précisément cette entité nosologique, en partie hétérogène.

## **II- Les Léiomyosarcomes**

### **2.1 Définition :**

Les léiomyosarcomes sont des tumeurs malignes mésenchymateuses composées de cellules à différenciation musculaire lisse. Elles se caractérisent sur le plan histologique par la présence de cellules épithéloïdes et fusiformes exprimant l'actine musculaire lisse, la desmine et la vimentine. Elles représentent 10 à 15% de l'ensemble des sarcomes (The histology of tumors of the soft tissues. WHO Classification).

### **2.2 Epidémiologie :**

Les léiomyosarcomes des tissus mous surviennent habituellement chez les personnes adultes plus de 50 ans. Ce sont les sarcomes prédominants des vaisseaux sanguins (Berlin et al., 1984) (Leu and Makek, 1986) (Varela-Duran et al., 1979) et ils constituent une grande partie des sarcomes rétro péritonéaux (Hashimoto et al., 1985) (Rajani et al., 1999) (Ranchod and Kempson, 1977) (Shmookler and Lauer, 1983) (Wile et al., 1981) et 10 à 15 % des sarcomes des membres.

## **2.3 Caractéristiques cliniques :**

Les léiomyosarcomes des tissus mous se présentent en général comme des lésions massiques. Les études d'imagerie montrent des masses de tissus mous non spécifiques mais suffisantes pour prédire la connexion aux structures adjacentes, particulièrement dans le rétropéritoineum. Dans les cas de léiomyosarcomes d'origine veineuse, le veinogramme pourrait montrer un composant intraluminal.

## **2.4 Histologie :**

Il est difficile de prédire le comportement clinique des léiomyosarcomes en utilisant le système de grade standard utilisé pour le diagnostic des sarcomes des tissus mous. Ce dernier est basé sur les caractéristiques morphologiques telles que le pléomorphisme des cellules tumorales, l'activité mitotique, le degré de la cellularité, la formation de matrice et la présence de nécrose (Guillou and Coindre, 1997). Bien que certaines études aient montré une corrélation entre la taille, le grade histologique de la tumeur de léiomyosarcome et son agressivité, les pathologistes ont eu recours à d'autres approches de classification de ces tumeurs pour mieux comprendre et prédire leurs comportements cliniques.

## **2.5 Localisation des léiomyosarcomes**

Les léiomyosarcomes surviennent au niveau de cinq sites anatomiques distincts. Les principaux sites tumoraux sont les membres, le rétropéritoine, l'utérus, les vaisseaux sanguins (notamment la veine cave inférieure et les veines larges des extrémités inférieures) (Farshid et al., 2002) et la peau (Dahl and Angervall, 1974; Hashimoto et al., 1986) (Stout and HILL, 1958). Les sarcomes touchant les artères notamment l'artère pulmonaire et les autres artères larges ne possèdent pas les caractéristiques des léiomyosarcomes et sont souvent classés comme sarcomes intimaux.

Les léiomyosarcomes présentent de multiples altérations génétiques et un caryotype très complexe avec plusieurs gains et pertes de fragments chromosomiques.

Aucune altération moléculaire spécifique, telle que la mutation d'un récepteur tyrosine kinase, pouvant guider une thérapeutique ciblée n'est identifiée à ce jour.

Cependant, de nombreuses anomalies cytogénétiques et moléculaires sont décrites. Nous les décrirons dans les chapitres suivants.

## **2.6 Génétique des léiomyosarcomes:**

Dans ce chapitre, nous décrivons les études cytogénétiques qui ont fourni de nombreuses données sur l'existence des anomalies chromosomiques dans les léiomyosarcomes.

Les premières études de caryotypage standard et des techniques d'hybridation fluorescente in situ dans les léiomyosarcomes ont montré des modifications génétiques complexes telles que des réarrangements structuraux au niveau des chromosomes 1, 7, 10, 13, 14, 16 et 17. (Boghosian et al., 1989), (Saunders et al., 1996).

En 2001, une analyse du caryotype de 11 léiomyosarcomes a montré une complexité au niveau de la plupart des caryotypes et une absence d'anomalies chromosomiques récurrentes, telles que des gains ou des pertes de matériel chromosomique (Wang et al., 2001). De plus, aucune corrélation n'a été trouvée entre le nombre ou le type d'anomalies avec la survie des patients.

Les puces à ADN, permettant l'évaluation des gains et pertes de segments de chromosomes, ont été utilisées par plusieurs groupes pour l'identification de marqueurs pronostiques dans les léiomyosarcomes.

Nous classons ces études par les profils d'expression génétique obtenus par des analyses de CGH array, des profils corrélés à l'histologie de la tumeur, des profils d'expression identifiant des gènes connus.

### **2.6.1 CGH Array**

Une étude d'évaluation des modifications du nombre de copies d'ADN dans 29 léiomyosarcomes par CGH (Comparative Genomic Hybridization) array a montré une fréquence élevée de perte de segments d'ADN dans les chromosomes 10q et 13q, où sont localisés les gènes suppresseurs de tumeurs PTEN et Rb, et des gains dans le chromosome 17p (contenant le gène p53). De plus, des amplifications ont été détectées au niveau des chromosomes 17p et 8q. Ces modifications cytogénétiques étaient corrélées à la taille des tumeurs dans cette étude (El Rifai et al., 1998). Ces résultats ont été retrouvés dans une étude portant sur 14 cas de léiomyosarcomes identifiant les mêmes gains et pertes chromosomiques

(Otano-Joos et al., 2000). D'autres analyses ont révélé une délétion au niveau du chromosome 19p dans toutes les tumeurs d'une série de 10 léiomyosarcomes analysés (Riva et al., 2000), ainsi qu'une délétion du chromosome 22 dans 6 des 10 tumeurs. D'une manière intéressante, p16INK4a et ARF, régulateurs critiques de RB et de p53 sont localisés sur le chromosome 19, d'où l'hypothèse que la délétion de ce chromosome contribuerait à la perte de ces gènes suppresseurs de tumeurs dans les léiomyosarcomes.

Dans une étude portant sur 27 tumeurs de léiomyosarcomes analysées par CGH, il est montré une forte amplification d'ADN dans 20 régions différentes dont les plus récurrentes sont 1p34, q21, 12q13-15, 17p et 22q. Les gains de segments chromosomiques les plus fréquemment retrouvés impliquent les chromosomes 1p3, 1q21, 15q12-15, 16p, 17p, 17q, 19, 20q, 22q et Xp. Des pertes significatives ont été trouvées sur le chromosome 13 dans 19/27 tumeurs avec une région commune au niveau de 13q14-21. D'autres pertes chromosomiques ont été aussi trouvées dans les chromosomes 1q, 2p, 2q, 4q, 9p, 10p, 10q, 11p, 11q23 et 16q (Derre et al., 2001).

### **2.6.2 Corrélation génotype/histologie**

Une corrélation a été montrée entre le caryotype et le type histologique de la tumeur, dans une étude de 15 cas de léiomyosarcomes ; toutes les tumeurs ayant un caryotype normal possèdent un type histologique classique alors que certaines tumeurs présentant un caryotype anormal sont du type pléomorphe ou myxoïde (Miyajima et al., 2002). Ceci suggère que certaines anomalies chromosomiques surviennent à des stades tardifs de la tumorigenèse dans les léiomyosarcomes ce qui pourrait modifier la morphologie de la tumeur. Les anomalies identifiées touchent les chromosomes 3p, 3q, 6q, 7p, 7q, 9p, 10p, 11p, 11q, 12p, 16q, 17p et 19q. Des gains dans les chromosomes 2, 5, 18, 20, 21, 22 et X ont aussi été identifiés (Man et al., 1996). Le chromosome 11q contient une mutation dans le gène d'ataxia telangiectasia (ATM) qui est impliqué dans le point de contrôle des phases G1-S du cycle cellulaire via la voie de signalisation de p53. D'ailleurs, des niveaux élevés de perte d'hétérozygotie du gène d'ATM ont été détectés dans le cancer du sein et l'insuffisance de ce gène pourrait promouvoir la progression tumorale (Bogdanova et al., 2009).

Une perte d'hétérozygotie sur le chromosome 3p14.2-23 a aussi été reportée dans ces tumeurs (Peng et al., 2003). Des modifications chromosomiques clonales ont été trouvées dans 14 sur 35 tumeurs de léiomyosarcome à cellules fusiformes et dans 3 sur 7 de type pléiomorphe (Mandahl et al., 1999).

### 2.6.3 Profils d'expression génique dans les LMS

Ces analyses portent sur les anomalies de l'expression des gènes et non pas sur les anomalies quantitatives de l'ADN. Bien qu'une étude ait montré un profil d'expression génique homogène de 17 léiomyosarcomes (Baird et al., 2005), la plupart des études de profils d'expression génique des léiomyosarcomes montrent que ces tumeurs possèdent des profils d'expression génique hétérogènes qui se regroupent dans certains cas avec les sarcomes pléomorphes tels que les histiocytofibromes malins (MFH) (Nielsen et al., 2002) (Francis et al., 2007) (Lee et al., 2003). La majorité des gènes trouvés fortement exprimés dans les léiomyosarcomes dans ces études, sont impliqués dans la différenciation musculaire lisse comme par exemple les gènes CALD1, MYL4 et SLMAP. La surexpression de ces gènes n'a pas été retrouvée dans l'ensemble des léiomyosarcomes analysés indiquant l'existence d'une variabilité significative au sein de ces tumeurs. Cela suggère aussi que certaines voies de signalisation pourraient être dérégulées dans certains sous-groupes mais pas dans d'autres. Dans le même contexte, Pérot et al. (Perot et al., 2009) ont démontré l'amplification de la région chromosomique 17p11.2-17p12 et l'expression de MYOCD comme cible de cette amplification dans les léiomyosarcomes localisés dans le rétropéritonéum en particulier, suggérant que la génétique de ces tumeurs pourrait être liée à leur localisation. MYOCD est un cofacteur transcriptionnel de SRF (serum response factor) qui régule le développement et la différenciation du muscle lisse (Du et al., 2003; Pipes et al., 2006; Wang et al., 2003; Wang et al., 2004). D'une manière intéressante, ils ont montré que ce gène induisait la différenciation musculaire lisse ainsi que la migration cellulaire dans des lignées de sarcome, évoquant que la différenciation de ces tumeurs bien différenciées pourrait être une conséquence d'une altération génomique acquise.

D'autres groupes de gènes ont permis de classer les léiomyosarcomes selon leur degré de différenciation ou leur pouvoir métastatique. Ceci est illustré dans une étude d'analyse génétique de 11 cas de léiomyosarcomes distinguant trois groupes de tumeurs classées selon leur profil d'expression génique (Boghosian et al., 1989; Ren et al., 2003). Ces profils d'expression corrélaient avec la différenciation et l'agressivité de la tumeur.

1. Le premier groupe, comprenant les léiomyosarcomes bien différenciés, est représenté par la surexpression des gènes liés à la différenciation neurale et la à signalisation du calcium.

2. Le deuxième groupe, incluant les tumeurs métastatiques avec une rechute clinique, est caractérisé par une forte diminution d'expression de plusieurs gènes comme celui de l'intégrine alpha 7, une protéine essentielle au maintien du contact cellulaire physiologique.

3. Le troisième groupe englobe les cas de léiomyosarcomes peu différenciés qui sont caractérisés par la surexpression des gènes liés à la réponse inflammatoire

#### **2.6.4 Altérations moléculaires :**

Dans cette deuxième partie, nous exposons les voies fréquemment altérées dans les léiomyosarcomes notamment celles de Rb-E2f et de MDM2-p53.

La famille des protéines RB comprenant les protéines pRB, p107 et p130 joue un rôle important dans le contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire et le maintien des cellules différenciées dans un état de quiescence réversible ou de sénescence permanente. (Cobrinik, 2005; Weinberg, 1995). Cette voie est altérée dans la plupart des cancers humains (Gillett et al., 1994; Schauer et al., 1994), incluant les sarcomes (Cance et al., 1990; Karpeh et al., 1995; Stratton et al., 1990). L'inactivation de pRb, un processus très commun dans les sarcomes, peut être la conséquence d'une perte d'hétérozygotie ou d'une modification post-translacionnelle comme l'hyper-phosphorylation. Ces deux mécanismes sont associés à la prolifération cellulaire de la tumeur et à la mauvaise survie des patients (Polsky et al., 2006). De même, l'absence d'expression de pRb a été trouvée dans 90% d'une série de 23 tumeurs de léiomyosarcomes, constituant une anomalie moléculaire intéressante dans ces sous-types de sarcomes (Dei Tos et al., 1996).

P53:

*p53*, un gène suppresseur de tumeurs, code pour un facteur de transcription qui s'active en réponse à tous les signaux de stress associés au cancer, comprenant le dommage de l'ADN et l'activation des oncogènes. Dans des conditions normales (cellules non stressées), les taux protéiques de p53 sont faibles et la protéine est inactive ; elle est associée avec l'oncoprotéine Mdm2, qui provoque son transport du noyau vers le cytoplasme et sa dégradation par la voie ubiquitine/protéasome (Murray-Zmijewski et al., 2008).

D'une manière intéressante, l'amplification du chromosome 17p contenant le gène suppresseur de tumeur p53 est trouvé amplifié dans les léiomyosarcomes (Wang et al., 2001).

Néanmoins, la délétion fréquente du chromosome 19p, sur lequel est localisé un autre gène suppresseur de tumeurs, ARF, suggère que l'inactivation de la voie p53 pourrait survenir via un mécanisme différent. De même, le gène COPS3 localisé sur la région 17p11-12 du chromosome 17 code pour une protéine capable de cibler la protéine p53 et de stimuler sa dégradation par la voie du protéasome, dans les ostéosarcomes (Henriksen et al., 2003). Nous pouvons donc imaginer un mécanisme semblable de dégradation de p53 dans les léiomyosarcomes disposant d'une amplification de 17p. De plus, une analyse de la pertinence clinique de la surexpression de p53 dans divers types de sarcomes de tissus mous, comprenant des léiomyosarcomes, a été réalisée par Marija Drobnjak et al. (Drobnjak et al., 1994). Cette équipe a rapporté une corrélation entre la surexpression de p53 et un index de prolifération élevé et le mauvais pronostic des patients dont 20 à 30 % de léiomyosarcomes.

Des mutations au niveau du gène p53 ont également été identifiées dans les léiomyosarcomes. Pollock et al (29) ont transfecté la lignée SK-LMS-1, qui présente une mutation au niveau du gène p53, par la forme sauvage de celui-ci pour voir si ce simple changement pourrait altérer le phénotype malin. Effectivement, une diminution de la prolifération et de la formation de colonies en agar mou *in vitro*, ainsi qu'une diminution de la tumorigénicité chez la souris *in vivo* ont été observées chez les cellules SK-LMS-1 transfectées par p53 sauvage d'une manière stable, suggérant un rôle de p53 dans la tumorigénèse des léiomyosarcomes.

MDM2 :

MDM2 (murine double minute protein 2), un régulateur négatif de p53, fonctionne comme une E3 ubiquitine ligase qui reconnaît le domaine de transactivation N-terminal (TAD) de p53 et comme inhibiteur de l'activation transcriptionnelle de celle-ci.

La surexpression de MDM2 conduisant à l'inactivation de p53 est reportée dans un tiers des sarcomes (Keleti et al., 1996; Taylor et al., 2000). Une recherche d'altération des gènes CDK4, MDM2, GLI et SAS localisés dans la région 12q13-15 a été menée au sein de 29 LMS et, dans 45% des cas, une amplification d'un ou plusieurs de ces gènes associée à une surexpression des protéines correspondantes était observée (Ragazzini et al., 2004). Cependant, une autre étude montre l'absence d'amplification au niveau de MDM2 et CDK4 dans tous les léiomyosarcomes testés (Shimada et al., 2006). Il est admis que l'amplification de *mdm2* est essentiellement retrouvée dans les sarcomes de type liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés (Binh et al., 2005).



p16INK4 $\alpha$  /CDKN2A: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

L'expression d'un autre gène suppresseur de tumeur a été également analysée dans les léiomyosarcomes : *p16INK4 $\alpha$ /CDKN2A*. CDKN2A, aussi connu sous le nom de p16 ou MTS1, est un gène suppresseur de tumeurs fréquemment muté dans les cancers. La protéine se lie aux kinases CDK4 et CDK6, inhibant ainsi leur interaction avec la cycline D et la phosphorylation de la protéine RB par CDK4. Ceci conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en G1. Une seule étude a montré une diminution de son expression dans les 25 tumeurs de léiomyosarcomes sur 77 examinés (Kawaguchi et al., 2003). Cette diminution d'expression de p16 a été significativement corrélée avec la taille des tumeurs et constituait le seul facteur pronostic indépendant pour un résultat clinique non favorable. L'inactivation du gène p16INK4 $\alpha$  dans cette étude n'est pas liée à des mutations dans les 49 léiomyosarcomes analysés. Cependant 15 tumeurs présentant une diminution d'expression de p16 ont révélé une méthylation du promoteur de son gène, un fait associé avec son inactivation et corrélé avec le mauvais pronostic.

DAP kinase: Death-associated protein kinase

Cette serine/thréonine kinase contient un domaine de mort et induit l'apoptose par différents mécanismes cellulaires, notamment en interagissant avec ERK (Chen et al., 2005) ou suite à un stress du réticulum endoplasmique (Gozuacik et al., 2008).

Par ailleurs, il y a quelques années, l'étude de l'altération génétique de DAP kinase (Death-associated protein kinase) et son rôle potentiel dans les léiomyosarcomes ont été examinés (Kawaguchi et al., 2004). Une série de 45 tumeurs a été étudiée ; 29 % des tumeurs exprimaient faiblement la DAP kinase. 54 % de ces dernières présentaient une délétion homozygote du gène ou une méthylation du promoteur, ce qui pourrait présenter un mécanisme alternatif expliquant la perte de fonction de la DAP kinase dans les léiomyosarcomes. Les altérations liées à la DAP kinase ou à p53, bien que rares, sont associées à un mauvais pronostic. Ceci suggère l'association de ces altérations pourraient favoriser la progression tumorale des léiomyosarcomes.

L'expression de gènes dans les léiomyosarcomes a été comparée à celle retrouvée dans le myomètre normal et 18 autres tissus. Ceci implique la surexpression des gènes CDKN2A, diaphanous-3, doublecortine, calpaïne 6, interleukine 17B et protéolipide 1 et la sous-expression des gènes alcool dehydrogenase 1B-polypeptide, insulin-like growth factor 1, c-jun, c-fos et TU3A (Hamosh et al., 2000; Lukas et al., 1995; Skubitz and Skubitz, 2003). Des

délétions ou des mutations de CDKIN2A ont été trouvées dans des tumeurs et des lignées cellulaires (Hamosh et al., 2000) (Kamb et al., 1994). Des anomalies de méthylation de l'ADN ont été détectées dans les léiomyosarcomes au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs RASSF1A, p16, MLH1, un mécanisme qui pourrait refléter leur état d'inactivation (Seidel et al., 2005). Une délétion homozygote de PTEN ainsi qu'une méthylation de son promoteur ont été aussi montrées dans certains cas de léiomyosarcomes (Kawaguchi et al., 2005).

L'ensemble de ces études met en évidence les multiples altérations génétiques et moléculaires trouvées dans les léiomyosarcomes. Certaines anomalies récurrentes, telles que celles de p53 et de pRb, corrélerent avec les caractéristiques cliniques et le pronostic et d'autres, moins fréquentes, comme celles de MDM2 et de CDK4 requièrent plus d'investigation.

Il est à noter que ces études basées sur des technologies génomiques doivent être couplées à des approches de validation fonctionnelle et moléculaire afin d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles. Nous analyserons dans la discussion le lien potentiel entre les altérations génétiques décrites précédemment et le profil d'expression protéique retrouvé dans nos études, notamment des kinases.

En effet, les kinases, et notamment les récepteurs tyrosine kinases, sont fréquemment activées de manière pathologique dans certains sarcomes des tissus mous par l'intermédiaire de mutations activatrices (GIST), de production de ligands anormaux (DFSP, PVNS) ou de transactivation de gènes codant pour des facteurs de croissance (IGF1R) par des protéines de fusion spécifiques (sarcomes d'Ewing, ASPS, Rhabdomyosarcomes).

Dans le chapitre suivant, nous décrirons les principales caractéristiques des récepteurs tyrosine kinase.

### **III- La famille des récepteurs tyrosine kinases (RTKs)**

Les récepteurs tyrosine kinases (RTK) sont des protéines transmembranaires essentielles à la communication cellulaire grâce à leur capacité à transduire des signaux extracellulaires. Ce sont des enzymes ayant une activité tyrosine kinase intrinsèque, qui catalysent le transfert d'un groupement phosphate d'une molécule ATP à un substrat protéique. Dans le génome humain, existent 58 récepteurs tyrosine kinases transmembranaires (Figure 1) et 32 protéines tyrosine kinases cytoplasmiques (Robinson et al., 2000). La famille des RTKs comprend les

récepteurs de l'insuline et de plusieurs autres facteurs de croissance, tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor) et le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).

Les « non-récepteurs » tyrosine kinases (NRTKs), ou tyrosine kinases cytoplasmiques, sont composés de 9 familles distinctes : Src, Jak, Abl, Fak, Fps, Csk, Syk, Pyk2 et Btk. Ces protéines peuvent être activées soit par les RTKs soit par d'autres récepteurs de surface comme les récepteurs couplés à la protéine G et les récepteurs du système immunitaire. Les RTKs ont un rôle fondamental dès le stade embryonnaire et au cours de la vie adulte dans de nombreux tissus et organes. Ils contrôlent des processus vitaux tels que la prolifération et différenciation cellulaire, le cycle cellulaire, la migration cellulaire, la survie cellulaire et les changements métaboliques (Schlessinger and Ullrich, 1992).

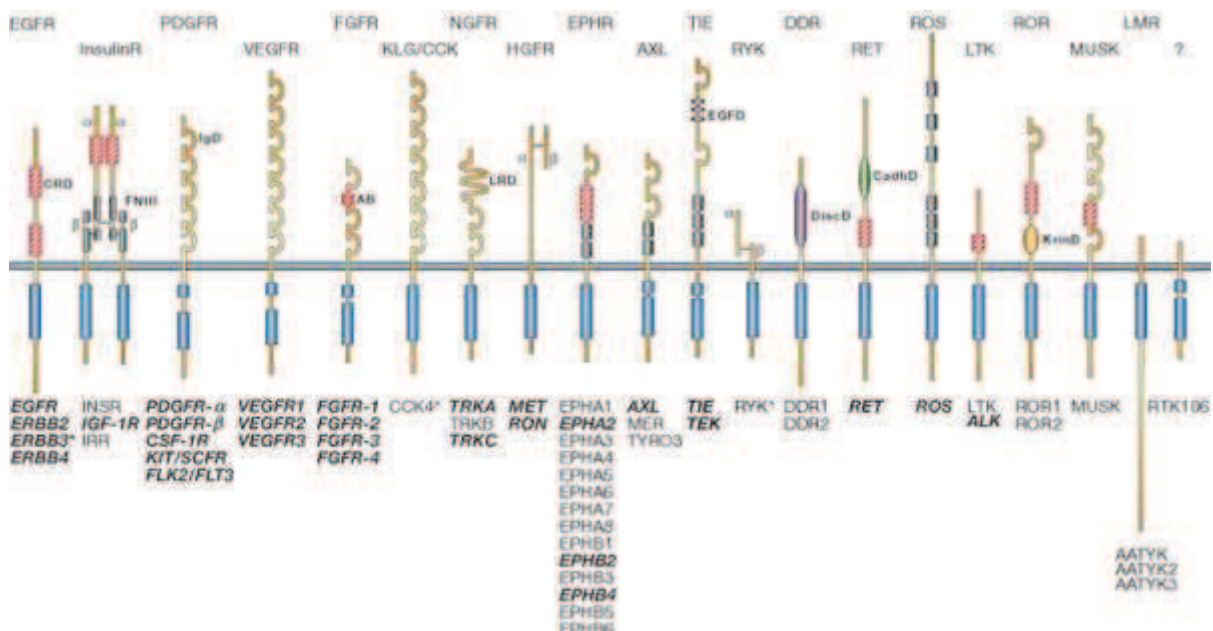


Figure 1: La famille des récepteurs protéine- tyrosine kinases chez l'homme (Blume-Jensen and Hunter, 2001)

Le récepteur prototype de chaque famille est indiqué au-dessus de chaque schéma de récepteur et les autres membres sont listés en-dessous.

Abréviations des récepteurs : EGFR, epidermal growth factor receptor ; InsR, insulin receptor ; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor ; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor ; FGFR, fibroblast growth factor receptor ; KLG/CCK, colon carcinoma kinase ; NGFR, nerve growth factor receptor ; HGFR, hepatocyte growth factor receptor ; EphR, ephrin receptor ; Axl, a Tyro3 PTK ; TIE, tyrosine kinase receptor in endothelial cells ; RYK, receptor related to tyrosine kinases ; DDR, discoidin domain receptor ; Ret, rearranged during transfection ; ROS, RPTK expressed in some epithelial cell types ; LTK, leucocyte tyrosine kinase ; ROR, receptor orphan ; MuSK, muscle-specific kinase ; LMR, Lemur.

D'autres abréviations : AB, acidic box ; CadhD, cadherin-like domain ; CRD, cystein-rich domain ; DiscD, discoidin-like domain ; EGFD, epidermal growth factor-like domain ; FNIII,

**fibronectin type III-like domain ; IgD, immunoglobulin-like domain ; KrinD, Kringle-like domain ; LRD, leucin-rich domain.**

**Les récepteurs en gras et en italique sont impliqués dans les cancers humains. Un astérisque indique que le récepteur est dépourvu d'activité kinase intrinsèque.**

### **3.1 Structure et mécanisme d'activation des RTKs:**

Un RTK comprend un domaine extracellulaire de liaison au ligand polypeptidique, un domaine transmembranaire et un domaine kinase cytoplasmique qui catalyse le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP à un groupement hydroxyle d'un résidu tyrosine d'une protéine. La phosphorylation des résidus tyrosine des protéines, une modification post-translacionnelle fortement régulée, est importante dans la communication inter et intracellulaire chez les métazoaires.

L'activation des RTKs requiert typiquement deux processus : le déclenchement de leur activité catalytique intrinsèque et la création de sites de liaison recrutant les protéines de signalisation en aval. La liaison au ligand induit une oligomérisation du récepteur, qui permet une juxtaposition des domaines tyrosine kinases cytoplasmiques (Schlessinger, 2000). Pour la majorité des RTKs, cette juxtaposition facilite l'autophosphorylation en trans des résidus tyrosine dans la région juxta membranaire, le domaine kinase, et les régions carboxy-terminales induisant des modifications conformationnelles nécessaires à la stabilité du récepteur dans son état actif (Hubbard, 2004). Ces résidus phospho-tyrosines servent de sites de recrutement pour de nombreuses protéines de signalisation en aval, telles que des enzymes et des protéines adaptatrices, via les domaines SH2 (Src homology-2) ou PTB (phosphotyrosine-binding) qui reconnaissent spécifiquement les résidus phospho-tyrosines (Pawson et al., 2001).

### **3.2 Les voies de transduction du signal des RTKs**

De grand progrès ont été accomplis depuis les années 1990 dans la compréhension des voies de signalisation intracellulaires induites par les RTKs. Récemment, de nouvelles voies de signalisation ont été décrites, autres que les effecteurs membranaires classiques qui activent les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT (Figure 2). L'ensemble de ces voies contrôle l'expression des gènes dans le noyau, régulant ainsi des processus fondamentaux de la physiologie cellulaire comme la prolifération, la différenciation, la migration et la survie. La coordination

des processus biologiques variés exercés par les RTKs est sous le contrôle de multiples mécanismes de régulation dans le but de maintenir l'homéostasie cellulaire. De nombreux RTK ont été identifiés comme oncogènes (Rodrigues and Park, 1994), (Hunter, 1997) et la dérégulation d'environ 50 % des gènes codant pour des RTKs est impliquée dans la progression de divers cancers humains (Blume-Jensen and Hunter, 2001). Les différents mécanismes liés à l'augmentation de l'activité catalytique des RTKs ont été identifiés. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer les translocations chromosomiques, l'amplification du récepteur et/ou de son ligand et les mutations ponctuelles (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Lamorte and Park, 2001).

Ces altérations impliquent plusieurs récepteurs dont *RET*, un corécepteur des facteurs neurotrophiques, la famille des récepteurs des facteurs de croissance des hépatocytes (HGF-R/c-MET), *KIT* le récepteur du SCF, la famille des récepteurs de l'EGF et la famille d'Axl. D'autre part, la signalisation excessive d'EGFR/HER1 suite à leur surexpression, mutation ou stimulation autocrine est retrouvée dans une grande variété des tumeurs solides. L'amplification du gène d'ERBB-2/HER2 a été décrite dans 20-30 % des cancers du sein métastatiques (Slamon et al., 1987) et une forte expression d'EGFR est trouvée dans divers types de carcinomes (cancer de la tête et du cou et tumeurs cervicales (Ekstrand et al., 1991)).

Cette classe de protéines est ainsi importante dans la transmission des signaux extracellulaires à l'intérieur de la cellule, constituant l'un des moyens les plus importants de communication cellulaire, toutefois, une dérégulation de leur signalisation peut mener à des graves pathologies comme le cancer.

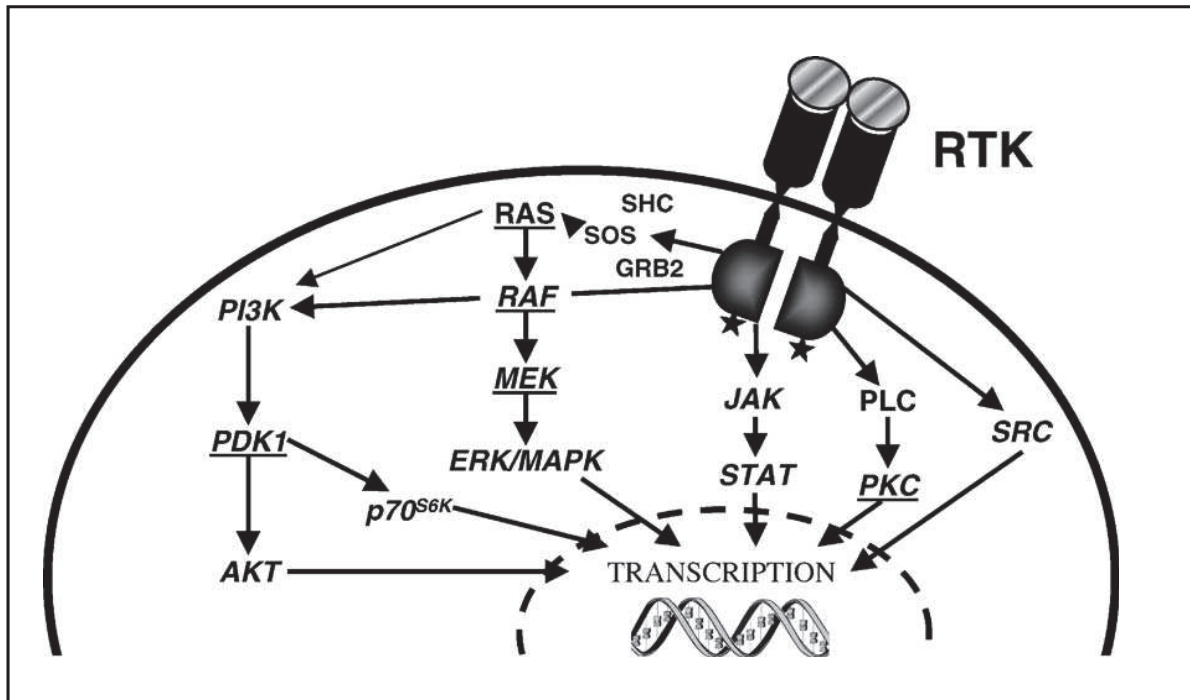


Figure 2: Schéma des voies de signalisation des RTKs (Bennasroune et al., 2004)

Abréviations: PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase ; PDK1, phosphoinositide-dépendant protein kinase-1 ; Akt, kinase oncogénique initialement isolée d'un rétrovirus murin transformant, aussi nommée PKB ; p70S6K, ribosomal S6 kinase ; Shc, (src homology collagen) ; Sos (son of sevenless) ; Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) ; Ras, oncogène initialement isolé d'un sarcome de rat ; Raf, kinase oncogénique initialement isolée d'un virus murin transformant ; Mek, Map/Erk kinase (ou Mkk : map kinase kinase) ; Erk/MapK, extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase ; Jak, janus kinase ; Stat, signal transducer and activator of transcription ; PLC, phospholipase C ; PKC, protein kinase C ; Src, oncogene d'un virus du sarcome Rous de poulet

### 3.3 La régulation négative de la signalisation des RTKs

De multiples mécanismes antagonistes inhibant la signalisation des RTKs ont été décrits. Ceux-ci interviennent à des niveaux distincts de la cascade de signalisation; au niveau de la liaison au ligand, de l'autophosphorylation du récepteur, de la stimulation de protéines inhibitrices qui contrebalancent la signalisation intracellulaire et enfin l'endocytose du récepteur et sa dégradation. D'autre part, il existe un autre type de régulation dit rétrocontrôle négatif, qui se met en place suite à une perturbation, pour maintenir l'équilibre intracellulaire (Casci et al., 1999; Fiorini et al., 2002; Ghiglione et al., 1999; Golembo et al., 1996; Tsang and Dawid, 2004).

### **3.3.1 Au niveau du ligand :**

Les études principales à ce niveau ont été faites chez la drosophile et ont amené à l'identification de deux protéines clés dans l'inhibition de la signalisation de DER, l'homologue de l'EGFR humain. DER est un RTK essentiel au cours du développement chez la drosophile et sa signalisation semble être inhibée par les protéines Argos et Kekk1 (Ghiglione et al., 1999; Musacchio and Perrimon, 1996; Schweitzer et al., 1995). Les données sur les mécanismes d'inhibition de la signalisation de DER par la protéine extracellulaire Argos sont différemment argumentées. Des études montrent une interaction directe entre les deux protéines (Jin et al., 2000; Schweitzer et al., 1995; Vinos and Freeman, 2000) et une étude récente montre un mécanisme d'inhibition de la signalisation de DER par Argos, via la séquestration du ligand actif (Klein et al., 2004). Pour Kekk 1, le mécanisme d'inhibition implique une interaction physique entre ses deux domaines extracellulaire et transmembranaire avec DER (Ghiglione et al., 1999), suggérant que Kekk 1 inhibe la liaison du récepteur à son ligand, ainsi que son autophosphorylation.

Chez l'homme, seul l'équivalent de la protéine Kekk 1 a été décrit, LRIG1 (Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domain 1). Il inhibe l'activation de l'EGFR par un autre mécanisme, en stimulant son ubiquitination et par la suite sa dégradation (Gur et al., 2004; Laederich et al., 2004).

D'ailleurs, un autre mécanisme de régulation négative des RTKs a été récemment décrit (Andl and Rustgi, 2005), impliquant une diminution de l'affinité du RTK pour son ligand via l'E-cadhérine. En interagissant avec l'EGFR, HGFR/MET et l'IGFR-1 par son domaine extracellulaire, la E-cadhérine inhibe la mobilité de ces récepteurs ainsi que leur affinité pour leurs ligands spécifiques, sans néanmoins perdre ses fonctions d'adhésion (Qian et al., 2004).

### **3.3.2 Au niveau du domaine kinase du récepteur :**

Cette régulation passe par les protéines tyrosine phosphatases (PTPs) qui déphosphorylent spécifiquement certaines tyrosines phosphorylées présentes sur les RTKs (Kovalenko et al., 2000; Ostman et al., 2006; Persson et al., 2004) et empêchent ensuite l'activation de la signalisation en aval. Parmi celles-ci, se trouvent PTP1B, RPTP $\sigma$  qui régulent négativement l'activation de l'EGFR (Haj et al., 2003; Lammers et al., 1993; Suarez et al., 1999), BDP1 (PEST-type protein-tyrosine phosphatase) un nouveau régulateur de ErbB2 (Gensler et al.,

2004), SHP-1 qui est identifié comme régulateur négatif du récepteur TrkA (Marsh et al., 2003) et SAP (SLAM-associated protein) qui interagit avec les trois récepteurs des facteurs neurotrophiques, TrkA, TrkB et TrkC (Lo et al., 2005). Récemment, Mig6, connu aussi sous le nom de RALT ou Gene 33, a été identifié comme un facteur exerçant un rétrocontrôle inhibiteur de différents RTKs, comme l'EGFR, le HRG- $\beta$  et le HGF/MET (Fiorentino et al., 2000; Fiorini et al., 2002; Hackel et al., 2001; Pante et al., 2005; Xu et al., 2005).

D'autres types de régulateurs négatifs peuvent inhiber l'activation des RTKs comme la protéine Herstatin, dérivée d'un épissage alternatif du gène ErbB2 et contenant un domaine extracellulaire tronqué. En dérégulant la dimérisation d'ErbB2, elle réduit sa phosphorylation (Doherty et al., 1999). Herstatin peut aussi réguler négativement les combinaisons d'interactions entre les différents RTKs qui confèrent des signaux de croissance synergétiques. Elle inhibe la transactivation de HER3 par HER2 et lie l'EGFR en bloquant son activation par l'EGF.

### **3.3.3 Les protéines inhibitrices de la cascade de signalisation :**

Il s'agit des protéines physiologiques inhibitrices Sprouty (Spry), Sef et PTEN, qui semblent inhiber sélectivement les deux voies majeures de la signalisation des RTKs, la voie Erk/MAP kinase et la voie PI3K/Akt.

La famille des Sprouty a émergé comme une classe majeure d'antagonistes inductibles par les facteurs trophiques, capables d'inhiber spécifiquement la voie Ras-Raf-Erk1/2 (Gross et al., 2001; Yusoff et al., 2002), activée par le FGFR, le HGFR/MET, le VEGFR, le récepteur du GDNF et RET (Impagnatiello et al., 2001; Kramer et al., 1999; Reich et al., 1999; Sasaki et al., 2003). Cette activité régulatrice exercée par Sprouty subit elle-même des contrôles selon les besoins cellulaires. En effet, l'ubiquitine-ligase E3 ligase c-Cbl contrôle les fonctions antagonistes de la protéine Sprouty en induisant son ubiquitination et sa dégradation. De même c-Cbl possède une fonction inhibitrice de l'activité des RTKs qui peut être abolie suite à son interaction avec Sprouty. Ce mécanisme a été décrit lors de l'augmentation de la signalisation de l'EGFR, et ceci d'une manière dépendante du type cellulaire (Egan et al., 2002; Rubin et al., 2003; Wong et al., 2002). Ces mécanismes reflètent la complexité des interactions cellulaires et de ses régulations.



Sef (Similar expression to fgf genes), un antagoniste récemment identifié code une protéine transmembranaire, conservée chez le zebrafish, la souris et l'homme (Kovalenko et al., 2003). Son mécanisme d'action reste controversé ; des études montrent qu'elle agit comme antagoniste de la voie Ras/MAPK activée par le FGF, suite à un rétrocontrôle négatif (Furthauer et al., 2002), tandis que d'autres rapportent que sa liaison au FGFR empêche la phosphorylation de ce dernier sur les résidus tyrosines (Kovalenko et al., 2003).

PTEN/MMAC1/TEP1 est un antagoniste de la PI3 kinase qui induit la dégradation des phosphatidyl-inositol (3,4,5) triphosphates (PI(3,4,5)P3). La dérégulation d'Akt, suite à la perte de fonction de PTEN, est impliquée dans la progression de différentes tumeurs (Simpson and Parsons, 2001).

### **3.3.4 L'ubiquitination et la dégradation du récepteur induite par le ligand :**

L'ubiquitination des RTKs constitue un signal important pour leur endocytose et leur dégradation dans les lysosomes ou les protéasomes. C'est une modification post-translacionnelle au cours de laquelle les protéines ubiquitines se lient de façon covalente à la protéine RTK cible. Dans la cascade enzymatique interviennent une enzyme d'activation (E1), une enzyme de conjugaison (E2) et une enzyme de ligation (E3). Les récepteurs poly-ubiquitinilés sont dégradés par le protéasome, alors que ceux qui sont mono- ou multi-ubiquitinylés sont internalisés et dégradés par les lysosomes (Haglund et al., 2003a; Thien and Langdon, 2001). La mono-ubiquitination de l'EGFR semble être suffisante pour son internalisation (Haglund et al., 2003b).

Les familles des protéines ubiquitine ligases impliquées dans ce processus sont celles de Cbl et Nedd (Harvey and Kumar, 1999; Thien and Langdon, 2005). Le membre le plus étudié de la famille des protéines Cbl est la protéine c-Cbl, qui interagit avec l'EGFR, le PDGFR, RET et MET conduisant à leur ubiquitination, soit directement en liant les résidus tyrosines des récepteurs, soit indirectement en s'associant à la protéine adaptatrice Grb2 (Jiang and Sorkin, 2003; Scott et al., 2005). Récemment, a été identifiée l'E3 ubiquitine ligase Nedd4-2 qui lie spécifiquement la partie c-terminale du récepteur TrkA et stimule sa dégradation régulant ainsi la survie neuronale induite par le NGF (Arevalo et al., 2006). LRIG1 peut interagir avec c-Cbl pour accélérer l'ubiquitination et la dégradation des quatre membres de la famille de l'EGFR (ErbB1, ErbB2, ErbB3 et ErbB4) (Gur et al., 2004; Laederich et al., 2004).

L'échappement à l'ensemble de ces mécanismes de régulations négatives est un événement important et fréquent de la dérégulation des RTKs dans les maladies néoplasiques. Nous citons quelques exemples ci-dessous :

La forme oncogénique du récepteur Mer (Trp-Met), constitutivement active, ne peut pas être liée à c-Cbl, et ne peut donc être ubiquitinée (Peschard and Park, 2003). De même, une mutation au niveau d'une tyrosine de la partie C-terminale de CSF-1R, qui est le site de liaison directe à c-Cbl, empêche son ubiquitination et sa dégradation (Mancini et al., 2002). Enfin, un mutant de l'EGFR dépourvu du site de liaison à c-Cbl, semble être plus mitogénique que le récepteur sauvage (Waterman et al., 2002).

Un autre mécanisme d'échappement à la régulation des RTKs est associé à un défaut d'endocytose au niveau de l'acheminement des clathrines. La molécule impliquée est Hip1, dont la fonction exacte dans l'endocytose n'est pas encore connue mais dont la surexpression induit une augmentation de prolifération et une diminution de l'expression des clathrines sur la membrane plasmique (Hyun and Ross, 2004).

Ces données suggèrent une troisième option thérapeutique pour les cancers associés à des dérégulations des RTKs, celle de l'induction de l'internalisation et de la dégradation du récepteur, complétant ainsi l'approche ciblant sa liaison au ligand (anticorps monoclonaux) ou son activité tyrosine kinase (inhibiteurs de tyrosine kinases).

### **3.4 Les interactions entre les RTKs et les autres récepteurs membranaires**

Pour réagir aux conditions complexes de son environnement, la cellule intègre les nombreux signaux extérieurs d'une manière appropriée, afin de maintenir son équilibre physiologique. Ces réponses sont initiées par les différents types de récepteurs présents sur la membrane plasmique tels que les RTKs, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) et les récepteurs d'adhésion cellulaire.

#### **3.4.1. Interactions avec les RCPGs**

Les molécules effectrices de la signalisation des RTKs telles que les voies des MAPK et de la PI3K sont également impliquées dans la signalisation d'autres récepteurs membranaires comme les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), les intégrines, CD44 et CD95.

Initialement il était admis que la voie de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) et celle des RTKs représentaient des voies linéaires distinctes convergeant vers des cibles communes, comme la p42/p44 MAPK. En réalité, on observe des interactions entre les deux systèmes récepteurs, à différents niveaux de la transduction du signal, de récepteur à récepteur, ou au niveau des molécules effectrices en aval (PI3K/Akt et MAPK). Dans certaines conditions, l'activation des RCPGs pourrait contribuer à l'activation des RTKs et au recrutement des protéines de signalisation comme Shc, Grb2 et Sos entraînant l'activation de la voie MAPK.

L'exemple le mieux étudié dans ce contexte est celui du récepteur de l'insuline (RTK) et le récepteur b2-adrénergique (RCPG) contrôlant le métabolisme du glucose. Dans ce modèle, le récepteur b2-adrénergique agit comme le substrat du récepteur de l'insuline (IRS), molécule d'interaction importante dans la signalisation de l'insuline. La phosphorylation du b2 AR Y350F par le récepteur de l'insuline permet la liaison des protéines contenant des domaines SH2 et SH3, telles que Grb2, la dynamine, Src et Shc, qui contribuent à l'internalisation du récepteur. La régulation du b2AR, et ainsi de son ligand la  $\beta$ -catécholamine par l'insuline, au niveau tissulaire, est cruciale pour le maintien du taux normal du glucose sérique.

Au niveau tissulaire, plusieurs interactions des RTKs avec les RCPGs ont été décrites, notamment dans le système nerveux central. Ceci implique l'EGFR, le PDGFR et les récepteurs Trk. Dans ce contexte, l'hormone gonadotrophique (GnRH) agit au niveau des neurones en activant directement son récepteur (RCPG) et ainsi les seconds messagers comme PKC,  $Ca^{2+}$  et Src/Pyk2 qui à leur tour activent indirectement un RTK comme l'EGFR. Ce dernier stimule la phosphorylation de la cascade des MAPK qui augmente l'activité de Ras GTP, et ainsi celle de Raf-MEK-ERK-RSK, aboutissant à l'activation des gènes impliqués dans la différenciation et la croissance cellulaire (Shah et al., 2003).

Un autre exemple, toujours dans les cellules neuronales, est celui de la transactivation du PDGFb R par les récepteurs de la dopamine D4 qui inhibe l'activité du récepteur NMDA (Kotecha et al., 2002). L'activation du PDGFb R induit la phosphorylation d'ERK1/2 et la stimulation du relargage du  $Ca^{2+}$  intracellulaire dépendant de PLC $\gamma$ , ce qui inactive le récepteur NMDA. Ce mécanisme suggère un rôle potentiel au récepteur PDGFR, au-delà de ses fonctions classiques, d'induction de la survie et de la différenciation cellulaire.

### **3.4.2 Interaction avec les intégrines et les kinases intracellulaires qui leur sont associées**

Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion cellulaire permettant l'ancrage de la cellule aux fibrilles protéiques composant la matrice extracellulaire. Certains membres de cette famille de récepteurs lient des protéines plasmiques ou des récepteurs sur d'autres cellules adjacentes. Les intégrines peuvent réguler les mêmes voies de signalisation que les récepteurs des facteurs de croissance, comme la voie Shc-Ras-MAPK (Wary et al., 1996). En effet, en plus de leur rôle dans les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire, les intégrines activent des voies de signalisation intracellulaires par l'intermédiaire des molécules adaptatrices comme FAK (focal adhesion kinase), ILK (integrin-linked kinase), PINCH (particularly interesting new cystein-histidine rich protein) et Nck2 (non-catalytic (region of) tyrosine kinase adaptor protein-2). Via ces molécules, la signalisation des intégrines rejoint celle des RTKs pour contrôler la survie, la prolifération, la forme de la cellule, ainsi que la polarité, l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire. Il a ainsi été démontré que plusieurs intégrines formaient des complexes avec les RTKs comme le PDGFR, l'EGFR, l'ErbB2 et c-Met entre autres (Borges et al., 2000; Falcioni et al., 1997; Mariotti et al., 2001; Miyamoto et al., 1996; Schneller et al., 1997; Sieg et al., 2000; Trusolino et al., 2001; Yu et al., 2000). Le récepteur RON s'associe avec diverses molécules transmembranaires comme les récepteurs des facteurs de croissance IL-3 beta, EPOR et MET ainsi qu'avec les molécules d'adhésion comme les intégrines et les cadhérines (Danilkovitch-Miagkova and Leonard, 2001).

Ces associations/transactivations de récepteurs de différentes familles élargissent le spectre de réponses cellulaires à un stimulus particulier. Par exemple, le changement de la forme des cellules est induit par l'activation du récepteur IL-3 beta induite par RON. De plus, l'activation des intégrines induit la phosphorylation de RON indépendamment de sa liaison au ligand MSP et la collaboration intégrines/RON peut réguler la survie cellulaire (Danilkovitch-Miagkova and Leonard, 2001). Nous avons ainsi un exemple d'un RTK (RON) qui peut être activé sans liaison à son ligand, mais par d'autres ligands stimulants leurs récepteurs respectifs associés à RON. Et inversement, ces derniers peuvent être activés suite à l'activation de RON par son ligand MSP.

A l'inverse, comme mentionné ci-dessus, l'interaction des RTKs comme l'EGFR avec l'E-cadhérine aboutit à la diminution de la mobilité du récepteur et de son affinité pour son ligand (Qian et al., 2004). D'où l'émergence d'un nouveau mécanisme d'inactivation des RTKs par

l'E-cadherine qui médie l'adhésion cellulaire. Ce qui laisse suggérer que la perte ou la régulation négative de l'expression de l'E-cadhérine pourrait contribuer à l'activation des RTKs fréquemment observée dans les tumeurs.

Les RTKs interagissent donc aussi avec FAK (Focal adhesion Kinase), une protéine tyrosine kinase cytoplasmique qui module l'adhésion cellulaire, la migration, la prolifération et la survie en réponse aux signaux extracellulaires (Schaller et al., 1992; Schaller et al., 1994), et qui présente un profil d'activation très spécifique dans les léiomyosarcomes comme nous le verrons dans le chapitre « Résultats ». FAK se lie par son domaine C-terminal à diverses protéines, telles que la paxilline, la taline, la PI3 Kinase et la protéine Graf (GTPase-activating protein), conduisant à la réorganisation du cytosquelette d'actine en se localisant dans les foyers d'adhésion ou contacts focaux, qui sont les sites de contact entre la cellule et la matrice extracellulaire, (Parsons, 2003; Schaller et al., 1994). La surexpression de FAK a été montrée dans le cancer du sein, de l'ovaire, du colon, de la thyroïde et dans les sarcomes. Elle est fréquemment associée à son activation, objectivée par la phosphorylation de la tyrosine 397 de la kinase, première étape de l'activation de cette voie ; la phosphorylation de FAKY397 est liée à la différenciation cellulaire dans les adénocarcinomes coliques, mais aussi à la perte de l'expression de l'E-Cadhérine dans la même pathologie (Cance et al., 2000; McLean et al., 2005; Schaller et al., 1994; Weiner et al., 1993). Les fonctions de FAK dans les tumeurs sont donc complexes, allant de l'induction de la survie en inhibant l'apoptose, à la modulation des interactions cellules-cellules et possiblement à la transition épithélio-mésenchymateuse (Frisch et al., 1996; Hanks and Polte, 1997; Schaller et al., 1992). Ce mécanisme peut avoir lieu via son interaction physique avec les RTKs. Par exemple, l'équipe de Garces a montré une co-localisation de FAK et de VEGFR3 dans les cellules d'adénocarcinome du sein, qui semble jouer un rôle important dans la survie des cellules, la dissociation de ce complexe conduisant à l'apoptose de la cellule tumorale (Garces et al., 2006). De même l'interaction physique entre l'IGF-1R et FAK induit un signal de survie cellulaire dans cellules humaines d'adénocarcinome du pancréas (Liu et al., 2008). FAK induit la phosphorylation et la stabilité de l'IGF-1R et de ses effecteurs en aval, comme ERK et AKT (Andersson et al., 2009). Ces données sont particulièrement intéressantes du point de vue thérapeutique et ouvrent de nouvelles perspectives sur le ciblage de l'association de FAK avec les RTKs. Une petite molécule organique a été développée pour cibler et rompre l'interaction entre les deux kinases, nommée pour le moment « Compound 32 » (Zheng et al., 2009a).

### 3.4.3 Interaction entre deux RTKs de différentes familles

Les interactions intracellulaires entre les RTKs décrites dans certains modèles tumoraux pourraient réduire l'efficacité des thérapies qui ne ciblent qu'un seul récepteur activé d'une façon incontrôlée. Parmi différents exemples, on peut citer celui de la co-activation de l'EGFR et de Met dans les glioblastomes multiformes (Stommel et al., 2007), ou dans les adénocarcinomes bronchiques résistants à l'erlotinib (Tang et al., 2008).

Dans les neuroblastomes, l'interaction entre les récepteurs Trk et les autres récepteurs de surface, Met ou Ret, augmente l'invasion via la surexpression de c-Met (Hecht et al., 2005), ou promeut la différenciation neuronale (Esposito et al., 2008; Matsushima and Bogenmann, 1993; Peterson and Bogenmann, 2004).

L'interaction des deux récepteurs est peut être nécessaire pour l'activation de l'un des deux récepteurs, de manière unilatérale. La suppression de l'expression de l'IGF-IR inhibe la phosphorylation de ErbB-2, tandis que le blocage de ce dernier n'affecte pas la phosphorylation de l'IGF-IR (Balana et al., 2001). Dans cette même étude, une association physique des deux récepteurs a été démontrée résultant dans la formation d'un complexe hétéromérique, notamment dans la lignée du cancer du sein MCF-7. Il a été suggéré que l'inhibition simultanée de l'IGF-IR et l'EGFR/ErbB-2 dans plusieurs lignées cancéreuses, avec de petites molécules ou avec des anticorps, induirait l'arrêt de la prolifération cellulaire comparé aux simples agents d'inhibition (Wilsbacher et al., 2008).

Ces interactions complexes sont observées avec les récepteurs qui font l'objet de notre travail personnel. Des interactions fonctionnelles entre Tyro-3, Axl et TrkA ont ainsi été démontrées à la surface cellulaire, durant la différenciation neuronale des cellules PC12. D'une manière très intéressante, l'expression de Tyro-3 et d'Axl dans ces cellules est induite par le ligand de TrkA (NGF) et il apparaît que la voie Gas6-Tyro-3/Axl est une voie de signalisation complémentaire de celle du NGF/TrkA au cours de la différenciation et de la survie neuronale (Zheng et al., 2009b). De même, une interaction entre Axl et le récepteur de l'interféron A (INFAR) à la surface cellulaire des cellules dendritiques et des macrophages, a été récemment décrite. Axl semble inhiber la réponse inflammatoire induite par la signalisation active du complexe INFAR et STAT1, afin de réguler le cycle inflammatoire (Lemke and Lu, 2003; Rothlin et al., 2007).

On le voit, il existe de multiples niveaux d'interactions entre les différents récepteurs tyrosine kinase dans les cellules tumorales. L'interaction de ces récepteurs n'est le plus souvent pas ou peu étudiée dans la compréhension de la résistance aux traitements ciblés, avec quelques

exceptions comme les travaux sur Met ou IGF1R, ou plus récemment Axl, et n'est pas utilisée en clinique.

Une approche protéomique intégrant différentes voies de signalisation paraît donc nécessaire pour tenter d'évaluer la complexité des interactions, en l'absence de mutations activatrices récurrentes connues.

Dans le chapitre suivant, nous décrirons les modèles tumoraux de sarcomes dans lesquels des activations et interactions de récepteurs tyrosine kinases sont identifiées.

## **IV- Les récepteurs tyrosine kinases activés dans les sarcomes**

Les événements génétiques contribuant à l'oncogenèse des sarcomes sont multiples : 1) translocations, 2) mutations de RTKs, 3) perte de gènes suppresseurs de tumeurs, 4) amplifications géniques.

Au moins trois types de protéines vont jouer un rôle oncogénique dans ce contexte : les facteurs de transcription aberrants, les facteurs de croissance et les RTKs constitutivement actifs.

### **4.1 Les facteurs de transcription anormaux induisent l'expression de récepteurs et de ligands**

Les rhabdomyosarcomes alvéolaires, tumeurs malignes musculaires agressives de l'enfant, présentent deux translocations chromosomiques t(2 ;13)(q35 ;q14) fréquentes (Davis et al., 1994; Galili et al., 1993), et d'une translocation moins commune t(1 ;13) (Davis et al., 1994). Dans les deux cas, un facteur transcriptionnel résulte de la fusion de la partie N-terminale PAX du domaine de liaison à l'ADN avec la partie c-terminale du domaine de transactivation de FOXO-1A (FKHR).

Parmi les gènes cibles de ce facteur de transcription figure le proto-oncogène MET qui est associé à la pathogenèse des rhabdomyosarcomes alvéolaires. Durant l'embryogenèse, MET est exprimé dans les cellules PAX3 positives, qui migrent du dermatome latéral vers le membre et forment la musculature du membre. D'une manière intéressante, les souris mutantes homozygotes pour MET ont un phénotype musculaire semblable à celui des souris mutantes homozygotes pour PAX3/Spotch, indiquant une implication des deux protéines

dans la voie du développement myogénique (Bladt et al., 1995). MET semble être un gène cible direct de PAX et de PAX3-FOXO1A (Epstein et al., 1996; Ginsberg et al., 1998). De plus, il a été montré que la surexpression de MET contribuait à la motilité, l'adhésion, la chimiotaxie, et l'invasion des cellules de rhabdomyosarcome alvéolaire *in vitro* (Jankowski et al., 2003). La tendance de ces cellules à former des métastases pourrait être expliquée par l'abondance locale de HGF qui agit comme un facteur chimiotactique pour les cellules exprimant MET. D'autres récepteurs pourraient jouer un rôle dans la migration des cellules de rhabdomyosarcome, comme CXCR4, le récepteur de SDF-1 (stromal-derived factor 1) (Libura et al., 2002).

Met est également associé à l'oncogenèse d'un sous-type rare de sarcomes, les sarcomes alvéolaires des tissus mous. Ceux-ci sont aussi caractérisés par une translocation chromosomique non-réciproque, dont le produit protéique transactive l'expression de *MET* (X ;17)(p11.2 ;q25) (Cullinane et al., 1992; Heimann et al., 1998).

## **4.2 Récepteurs et ligands : parfois des partenaires dans les produits de translocations**

Un autre type de sarcome présente une translocation chromosomique réciproque t (17 ; 22) (q22 ; q13.1), les dermatofibrosarcomes protuberans (DFSB), un rare cancer de la peau survenant à un grade bas à intermédiaire. Des réarrangements moléculaires en dérivent, caractérisés par la fusion du gène COL1A1 localisé sur le chromosome 17 avec le gène PDGFB sur le chromosome 22 (Pedeutour et al., 1995; Simon et al., 1997). PDGFB est un homodimère et un mitogène potentiel dans différentes lignées cancéreuses (Heldin et al., 1998). Il est suggéré que la fusion avec COL1A1 pourrait conduire à une surexpression du PDGFB, la juxtaposition de COL1A1 (comprenant le promoteur et les exons de COL1A1) causant la perte des régulateurs négatifs de la transcription et de la translation du PDGFB (Simon et al., 1997). Ainsi, la fusion de COL1A1 avec PDGFB constitue un mécanisme expliquant l'activation inappropriée de PDGFB dans les DFSP, activant par la suite la voie de signalisation de PDGFRB. Ceci a conduit à l'utilisation des inhibiteurs tyrosine kinase comme l'imatinib mesylate (STI571) ciblant la voie du PDGFRB (Greco et al., 2001; Rubin et al., 2002). Il y a quelques années, l'imatinib a montré une activité clinique uniquement dans les DFSP primaires et métastatiques présentant la translocation t(17 ;22) (McArthur et al., 2005).



Un autre type de sarcome pédiatrique, les fibrosarcomes congénitaux caractérisés par une translocation t(12;15)(p13;q25) résultant en une fusion de ETV6 (TEL) avec un RTK, le récepteur de la neurotrophine 3 (NTRK3 ou TRKC) (Knezevich et al., 1998). La protéine de fusion résultante présente une activité protéine tyrosine kinase (PTK), s'homodimérise, forme des hétérodimères avec la protéine native ETV6 et s'autophosphoryle sur les résidus tyrosine (Lannon and Sorensen, 2005). Les expériences de mutagenèse ont démontré que le motif de dimérisation HLH de ETV6 et le domaine PTK de NTRK3 étaient requis conjointement pour le processus de transformation (Wai et al., 2000). Récemment a été démontrée l'association du substrat de l'IGF-IR (IRS-1) avec la protéine de fusion (ETV6-NTRK3) dans les cellules transformées par cette dernière (Morrison et al., 2002). En effet, l'IRS-1 semble être la molécule adaptatrice liant ETV6-NTRK3 aux deux voies Ras-MAPK et PI3K-AKT promouvant la croissance et la survie dans les cellules de FSC (Martin et al., 2006). Le complexe IRS-1/ETV6-NTRK3 lie Grb2 et la sous-unité régulatrice p85 de la PI3Kinase (Morrison et al., 2002) et ceci est facilité par sa localisation au niveau de la membrane cellulaire (Martin et al., 2006). Enfin, ceci aboutit à l'induction des gènes impliqués dans la prolifération tels que CCND1 et PCNA, comme l'ont démontré les analyses de microarray dans les cellules NIH3T3 exprimant ETV6-NTRK3 (Lannon and Sorensen, 2005). Ces observations montrant la coopération des récepteurs tyrosine kinases dans un sous-type de sarcomes, encouragent les recherches sur l'implication de ces oncogènes dans la progression tumorale des sarcomes.

### **4.3 RTK mutés : l'exemple des tumeurs stromales gastrointestinales (GIST)**

L'exemple le plus intéressant est celui des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST), qui sont caractérisées par la présence de mutations activatrices de KIT (Hirota et al., 1998), un RTK du stem-cell factor (SCF). Ces mutations surviennent essentiellement au niveau des exons 9 et 11, et de manière moins fréquente au niveau des exons 13, 14 et 17 (Corless et al., 2004). Plus récemment a été identifié un sous-groupe de GIST ne présentant pas de mutations de KIT mais des mutations activatrices du gène codant pour le PDGFRA (platelet-derived growth factor receptor alpha) (Heinrich et al., 2003b). Le ciblage de KIT par des inhibiteurs spécifiques de tyrosine kinases (imatinib, sunitinib et plus récemment nilotinib) est le premier

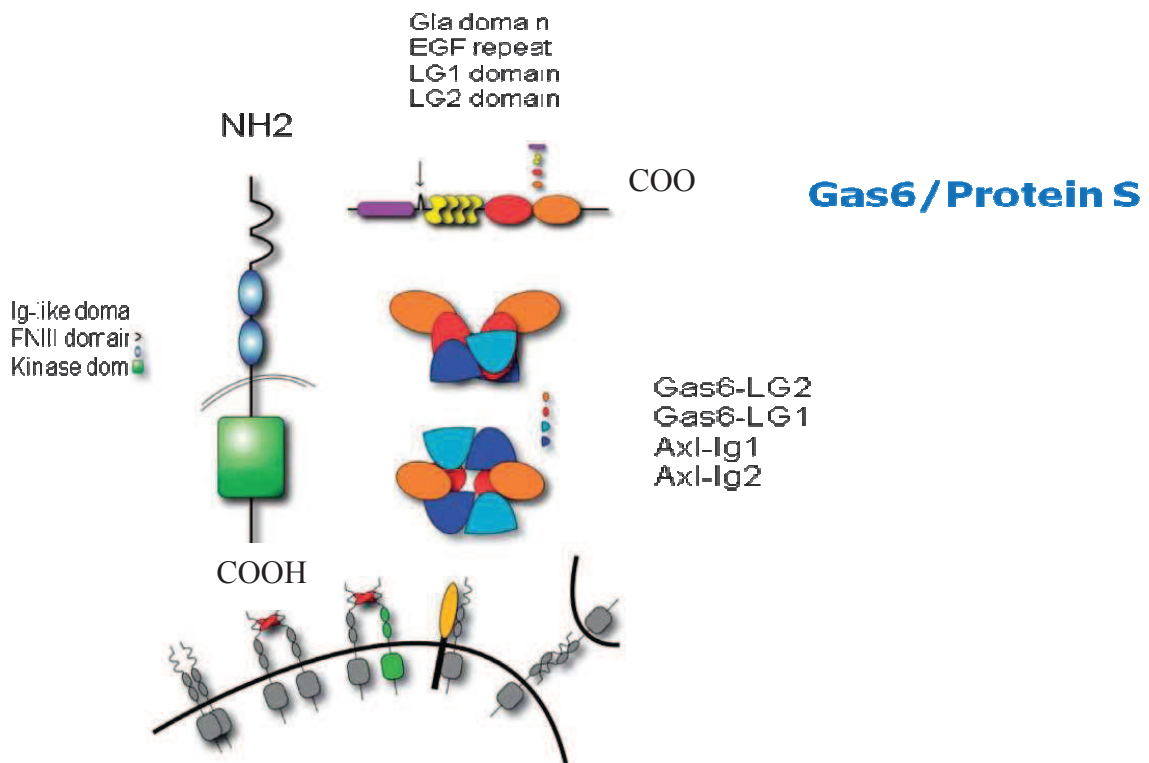
traitement ciblé ayant démontré un gain de survie chez des patients résistants à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Blanke et al., 2008; Demetri et al., 2002).

Enfin, nous décrivons la famille des récepteurs TAM, que notre travail présente comme potentiellement impliquée dans la physiopathologie des léiomyosarcomes.

## **V- La famille des récepteurs TAM (Tyro-3, Axl et Mer)**

La famille des récepteurs TAM comprenant trois récepteurs, Tyro-3 (Tif, Sky, Rse, Dtk), Axl (Ufo et Ark) et Mer (Eyk) (Crosier and Crosier, 1997), est très proche de la famille des RTK Met (composée de Met et de Ron), sur la base de la composition du domaine kinase en acides aminés (Robinson et al., 2000). Elles activent toutes deux des voies de signalisation conduisant à des fonctions similaires (Birchmeier et al., 2003; Hafizi and Dahlback, 2006). Alors que Axl et Tyro-3 partagent les mêmes structures génomiques ayant le même nombre (20) et la même taille d'exons (Lewis et al., 1996; Lu et al., 1999; Schulz et al., 1993), Axl et Mer présentent les séquences d'acides aminés du domaine tyrosine kinase les plus similaires (Graham et al., 1995; Robinson et al., 2000).

## Tyro3/Axl/Mer



### Schémas de structure, liaison et activation des récepteurs TAM et leurs ligands

(A) Domaine d'organisation de Tyro-3, Axl, et Mer. La séquence conservée dans le domaine kinase est indiquée. (B) Domaine de structure des ligands des récepteurs TAM, Gas6 et la protéine S. La protéine S contient les sites de clivage de la thrombine dans la région boucle n'activant pas Axl. (C) Axl lie Gas6 dans une stœchiométrie 2 :2 comme c'est montré du côté (i), et du haut (ii). (D) Les possibilités d'activation des récepteurs TAM comprennent : (i) dimérisation indépendante du ligand, (ii) dimérisation dépendante du ligand, (iii) dimérisation hétéromérique de deux récepteurs TAM différents, (iv) dimérisation hétérotypique avec un non récepteur TAM, et (v) liaison trans-cellulaire de domaines extracellulaires

## 5.1. Profil d'expression des récepteurs TAM

Les ARN messagers des récepteurs TAM ont été observés dans les tissus embryonnaires (Crosier et al., 1996; Faust et al., 1992; Graham et al., 1995; Lai and Lemke, 1991), mais ne sont pas essentiels à l'embryogenèse : les souris simple, double et triple knockouts sont viables et leur développement est normal à la naissance (Lemke and Lu, 2003 ; Lu and Lemke, 2001 ; Lu et al ; 1999).

Au niveau des tissus adultes, Tyro-3, Axl et Mer sont exprimés de façon ubiquitaire. Tyro-3 est abondamment trouvé dans le système nerveux, les ovaires, les testicules, les seins, les poumons, les reins, les ostéoclastes et la rétine, ainsi que dans les lignées cellulaires hématopoïétiques comme les monocytes/macrophages et les plaquettes (Angelillo-Scherrer et al., 2001; Katagiri et al., 2001; Lai et al., 1994; Lu and Lemke, 2001; Mark et al., 1994; Prasad et al., 2006). Axl a également une expression ubiquitaire (O'Bryan et al., 1991) avec de forts niveaux d'expression dans l'hypothalamus et le cervelet (Bellosta et al., 1995), dans les monocytes/ macrophages, les plaquettes, les cellules endothéliales, le cœur, le muscle squelettique, le foie, les reins et les testicules (Angelillo-Scherrer et al., 2001; Behrens et al., 2003; Graham et al., 1994). Des niveaux élevés d'expression de Mer sont aussi détectés dans les ovaires, la prostate, les testicules, les poumons, la rétine et les reins, et une faible expression est trouvée dans le cœur, le cerveau et le muscle squelettique (Graham et al., 1994; Prasad et al., 2006). Parmi les cellules hématopoïétiques, Mer est exprimé dans les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les cellules NK, les cellules NKT, les mégacaryocytes et les plaquettes (Angelillo-Scherrer et al., 2001; Behrens et al., 2003; Graham et al., 1994).

## 5.2 Deux ligands : Gas6 et la protéine S

Deux ligands ont été identifiés pour les récepteurs TAM : les protéines dépendantes de la vitamine K, Gas6 pour Growth arrest-specific gene 6, et un facteur anti-coagulant la protéine S. Gas6 a été découvert parmi d'autres gènes, en 1988 et nommé en référence à sa production par des cellules en phase quiescente du cycle cellulaire (Schneider et al., 1988). Il a ensuite été analysé, en 1993, par l'équipe de Manfioletti (Manfioletti et al., 1993) et, deux ans après, le gène Gas6 humain a été identifié sur le chromosome 13q34 par la technologie d'hybridation in situ fluorescente (Saccone et al., 1995). Les deux ligands partagent 44 % de

similarité comprenant des motifs structuraux contenant la partie amine gamma-carboxylée terminale (Gla domaine), quatre répétitions en tandem des domaines EGF-like et un domaine carboxy-terminal similaire à la sex hormone-binding globulin, SHBG) (Manfioletti et al., 1993). Cependant, contrairement à la protéine S, Gas6 ne possède pas le site de clivage de la thrombine, site typique des facteurs de coagulation dépendants de la vitamine K.

En 1995, Gas6 a été identifié comme ligand pour Axl (Stitt et al., 1995; Varnum et al., 1995), alors que la protéine S a été décrite comme ligand pour Tyro-3 (Stitt et al., 1995). Bien que plusieurs études aient montré que Gas6 pouvait lier et activer les trois membres de la famille des récepteurs TAM, cette théorie n'a pas été validée pour la protéine S, et cela a été le sujet d'un grand débat (Chen et al., 1997; Godowski et al., 1995; Mark et al., 1996; Nagata et al., 1996; Ohashi et al., 1995). Il a été montré que les protéines S d'origine humaine et bovine sont capables d'activer Tyro-3 murin (Nyberg et al., 1997; Stitt et al., 1995), alors que la protéine S humaine, même à forte concentration, n'active pas Tyro-3 humain (Godowski et al., 1995; Ohashi et al., 1995). Prasad et al. ont récemment démontré que la Protéine S murine liait et activait les récepteurs murins Mer endogène et Tyro-3 exprimé d'une manière hétérologue (Prasad et al., 2006). Il n'y a pas d'évidence que la protéine S puisse activer Axl. D'autre part, l'affinité de liaison de Gas6 pour chacun des trois récepteurs a été évaluée, et il est montré que la liaison de Gas6 à Axl (constante d'association  $K_a$  :  $16.8 \pm 0.3 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1} \cdot 10^4$ ) est plus rapide que celle observée avec Tyro-3 ( $K_a$  :  $6.5 \pm 0.5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1} \cdot 10^4$ ) et Mer ( $K_a$  :  $6.1 \pm 0.6 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1} \cdot 10^4$ ). De plus, les taux de dissociation de Gas6 des récepteurs Axl et Tyro-3 étaient similaires avec des constantes de dissociation ( $K_d$ ) de  $2.7 \pm 0.1 \text{ s}^{-1} \cdot 10^4$  et  $2.4 \pm 1.2 \text{ s}^{-1} \cdot 10^4$  respectivement, alors qu'il est plus élevé dans le cas de Mer ( $K_d$  :  $5.9 \pm 1.7 \text{ s}^{-1} \cdot 10^4$ ) (Chen et al., 1997; Fisher et al., 2005).

Malgré leur similarité au niveau de la structure protéique, la protéine S et Gas6 exercent des fonctions différentes du fait notamment de leurs profils d'expression tissulaire différents. La protéine S est synthétisée principalement par les hépatocytes, mais également par les cellules endothéliales, les mégacaryocytes, voire le cerveau et les cellules de Leydig. Sa concentration plasmatique est de 25 mg/L.

Gas6 est exprimée dans les cellules différenciées de la plupart des organes, en particulier les cellules endothéliales, les cellules vasculaires musculaires lisses (CVMLs) et les neurones (Manfioletti et al., 1993; Prieto et al., 1999). En général, Gas6 n'est pas détecté dans le plasma sanguin, les macrophages, les basophiles, les neutrophiles ou les lymphocytes périphériques. Dans des conditions pathologiques, Gas6 est surexprimé au niveau des sites d'inflammation, des blessures des vaisseaux et dans les cellules vasculaires musculaires lisses

des plaques athérosclérotiques (Luttun and Carmeliet, 2001; Melaragno et al., 1998). Peu après sa découverte, Gas6 a été décrit comme facteur de croissance capable de protéger différents types cellulaires contre l'apoptose (Nakano et al., 1995). Les modèles murins dans lesquels le gène Gas6 a été invalidé ont permis de mettre en évidence l'importance de son rôle dans la thrombose (Angelillo-Scherrer et al., 2001). Ces souris mutantes sont protégées contre la thrombose artérielle et veineuse sans risque hémorragique accru. Le mécanisme anti-thrombotique de la déficience en Gas6 semble être lié d'une part à un défaut d'agrégation et de sécrétion plaquettaire et Gas6 semble agir comme un amplificateur de la réponse des plaquettes à leurs agonistes, de manière autocrine en étant sécrété à partir des granules lors de l'activation plaquettaire initiale.

Gas6 est également impliqué dans la survie et la prolifération cellulaire de nombreux types cellulaires tels que les cellules endothéliales (O'Donnell et al., 1999), les cellules musculaires lisses des vaisseaux (Nakano et al., 1995; Nakano et al., 1996), les cellules mésangiales (Yanagita et al., 2001), les ostéoclastes (Katagiri et al., 2001), les chondrocytes (Loeser et al., 1997), les cellules de Schwann (Li et al., 1996), les cellules épithéliales (Hall et al., 2001), les fibroblastes NIH3T3 (Goruppi et al., 1996; Goruppi et al., 1997) et les fibroblastes cardiaques (Stenhoff et al., 2004).

Il y a quelques années, le groupe de Goruppi a montré que la signalisation de Gas6/Axl stabilisait, dans la lignée d'adénocarcinome mammaire C57MG, une forme transcriptionnelle active de la  $\beta$ -caténine (Goruppi et al., 2001). La surexpression des deux protéines Gas6 et Axl a aussi été retrouvée dans une série de carcinomes mammaires (Berclaz et al., 2001). Dans des lignées de cancer du sein, l'expression de Gas6 semble être induite par la progestérone via son récepteur (PRB) (Richer et al., 2002). Plus récemment, sur 49 échantillons de carcinomes mammaires primaires, l'expression de Gas6 a été retrouvée associée à celle du récepteur de la progestérone et corrélée aux marqueurs de pronostic favorable comme une petite taille des tumeurs et l'absence d'envahissement lymphatique (Mc et al., 2008).

La surexpression de Gas6 et Axl a été retrouvée dans les carcinomes d'ovaire, de l'endomètre et de la prostate, tumeurs hormono-dépendantes ((Sainaghi et al., 2005; Sun et al., 2003). Dans les léiomyomes utérins, il est suggéré que Axl et Gas6 stimulent la croissance de ces tumeurs. L'expression de Tyro-3, analysée au niveau ARNm et protéique, semble être plus faible que celle d'Axl sur tous les échantillons analysés. Les niveaux de Gas6 et d'Axl étaient significativement plus élevés dans les léiomyomes utérins que dans le myomètre utérin normal pour chaque patient parmi les 30 étudiés (Sun et al., 2003). Cependant, aucune

altération significative durant le cycle menstruel n'a été détectée en présence de l'expression de Gas6 et de Axl dans le myomètre normal ainsi que dans le léiomyome utérin (Sun et al., 2002).

## **5.3 Fonctions cellulaires des récepteurs TAM**

Les récepteurs TAM peuvent exercer diverses fonctions cellulaires suivant la combinaison ligand-récepteur, le type cellulaire et le microenvironnement. Leurs rôles dans différents types cellulaires sont identifiés aussi bien dans les conditions normales que pathologiques. Les altérations génétiques ou expérimentales de leurs fonctions peuvent contribuer à différentes pathologies telles que la coagulopathie, les maladies autoimmunes, rétinite pigmentaire et le cancer.

### **5.3.1 Phagocytose des cellules en apoptose**

Les souris, dont les gènes des trois récepteurs sont invalidés, développent des maladies auto-immunes incluant l'arthrite rhumatoïde et le lupus (Cohen et al., 2002; Lemke and Lu, 2003), alors que les souris knock-out pour Mer seul présentent des pathologies auto-immunes (Scott et al., 2001). La perte de ces protéines entraîne l'accumulation des cellules apoptotiques et l'activation constitutive du système immunitaire aboutissant à la nécrose des tissus. Les études des simples, doubles et triples mutants ont montré par la suite, que ce phénotype procédait de la perte de l'expression de ces récepteurs sur les macrophages et les cellules dendritiques (Lu and Lemke, 2001). Les macrophages reconnaissent les cellules apoptotiques via leurs récepteurs de surface de deux manières différentes: directement via les récepteurs de la phosphatidyl sérine (PS) ou indirectement via les trois récepteurs TAM (Graham et al., 1994; Lu and Lemke, 2001; Neubauer et al., 1994), liés à leurs ligands Gas6 et la protéine S. Ces derniers semblent stimuler l'élimination des cellules apoptotiques en formant un pont entre celles-ci exprimant la PS et les macrophages exprimant les récepteurs TAM. La protéine S lie les cellules apoptotiques et stimule leur phagocytose (Anderson et al., 2003), sans que l'activation d'un récepteur TAM ait pu être observée lors de ce processus.

Gas6 induit l'élimination des liposomes exprimant la PS par les macrophages, un phénomène bloqué par le domaine extracellulaire d'Axl démontrant son implication dans cette phagocytose (Ishimoto et al., 2000). De la même manière, la forme soluble de Mer lie le

domaine Fc des immunoglobulines humaines G (Mer-Fc) et inhibe la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages (Sather et al., 2007). D'autres études ont montré que le rôle de Mer ne résidait pas seulement dans la liaison des cellules apoptotiques mais aussi dans le changement de leur conformation associé à leur « englobement »- (Cohen et al., 2002; Guttridge et al., 2002; Hu et al., 2004; Scott et al., 2001; Todt et al., 2004). Le mécanisme d'action a été détaillé ultérieurement par l'équipe de Wu (Wu et al., 2005), qui a montré que les domaines tyrosine kinase des récepteurs TAM, en particulier Mer, activaient les voies de signalisation intracellulaires, comprenant les intégrines comme  $\alpha V\beta 5$  qui contribuent au changement du cytosquelette nécessaire pour l'engouffrement des cellules apoptotiques.

L'élimination des cellules apoptotiques est dépendante du microenvironnement et du type de phagocyte. Les macrophages et les cellules dendritiques utilisent différemment les récepteurs TAM pour exercer leurs fonctions. Une étude récente (Seitz et al., 2007) a démontré que, durant la phagocytose, les macrophages utilisaient davantage le récepteur Mer tandis que les cellules dendritiques utilisaient Axl et Tyro-3. Ceci a confirmé une étude antérieure sur les cellules dendritiques de souris knock-out pour Mer, qui présentent une phagocytose normale des cellules apoptotiques (Behrens et al., 2003). Le récepteur Mer joue aussi un rôle fondamental dans le fonctionnement et dans le relargage des cytokines des lymphocytes T Natural killer (NKT) (Behrens et al., 2003). Les cellules Natural killer (NK) expriment Axl et Tyro-3 et les trois récepteurs TAM sont essentiels pour leur différenciation normale et leur maturation fonctionnelle (Caraux et al., 2006).

### **5.3.2 Fonction des TAM sur les plaquettes sanguines**

L'analyse des souris knock-out pour Gas6 met en évidence le rôle important des récepteurs TAM dans la fonction des plaquettes, notamment dans l'agrégation plaquettaire (Angelillo-Scherrer et al., 2001). En effet, les plaquettes expriment Tyro-3, Axl et Mer et l'utilisation de souris knock-out pour chacun des trois récepteurs permet de démontrer qu'ils sont tous nécessaires pour l'agrégation normale des plaquettes (Angelillo-Scherrer et al., 2005). Les souris Gas6<sup>-/-</sup> sont protégées contre la thrombose, comme les souris knock-out pour chacun des trois récepteurs TAM.

D'autres fonctions sont associées à cette famille de récepteurs, au niveau de divers systèmes biologiques, notamment le système nerveux central et le système reproducteur.



### **5.3.3 Système nerveux central**

Les trois récepteurs et leur ligand mutuel Gas6 sont exprimés dans le système nerveux central (Lai and Lemke, 1991; Mark et al., 1994; Prieto et al., 1999). L'activation par Gas6 de Axl dans les cellules neuronales induit leur survie et leur migration (Allen et al., 1999; Nielsen-Preiss et al., 2007). Gas6 inhibe la mort cellulaire des neurones de l'hypothalamus exprimant Tyro-3 et déprivés en sérum (Funakoshi et al., 2002).

### **5.3.4 Spermatogenèse**

L'infertilité des souris triple knock-out, due à la dégénération des cellules germinales une semaine avant la maturité sexuelle, implique que les récepteurs TAM fonctionnent conjointement pour réguler la spermatogenèse (Lu et al., 1999). La mort des cellules germinales résulte, dans ces souris, d'une inhibition de la communication essentielle entre les cellules de Sertoli exprimant les récepteurs TAM et les cellules de Leydig exprimant leurs ligands Gas6 et la protéine S. Par ailleurs, le défaut de migration des neurones GnRH, régulée par les récepteurs TAM, pourrait inhiber de la maturité sexuelle et contribuer ainsi à l'infertilité de ces souris knock-out.

### **5.3.5 Cellules musculaires lisses des vaisseaux**

En plus de leurs rôles fonctionnels dans les conditions physiologiques normales, les récepteurs TAM, et en particulier Axl, sont impliqués dans les pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose, caractérisée par l'accumulation des cellules vasculaires musculaires lisses (CVMLs).

Gas6 induit la migration des CVMLs surexprimant Axl (Fridell et al., 1998) et les protège de l'apoptose induite par la déprivation en sérum (Melaragno et al., 2004). Il a aussi été démontré que Gas6 stimulait l'expression des récepteurs scavengers dans une lignée cellulaire humaine de CVMLs (Murao et al., 1999). Ces récepteurs facilitent l'élimination des LDL (low-density lipoprotein) qui contribuent à la transformation des CVMLs en cellules spumeuses et au développement de l'athérosclérose. Cette même équipe a récemment approfondi ces observations en examinant la voie de signalisation intracellulaire dépendante de Gas6 et requise pour l'induction de l'expression du récepteur scavenger de classe A (RSA)

sur les CVMLs. Ils ont ainsi démontré la nécessité de l'activation de la protéine kinase B/AKT pour l'induction d'expression du gène de RSA par Gas6 (Ming et al., 2001), une observation que nous mettrons en parallèle avec nos données sur les cellules de léiomyosarcome. Dans les lésions athérosclérotiques avancées, les récepteurs TAM pourraient avoir un impact positif sur l'évolution de la maladie, en permettant l'ingestion des macrophages apoptotiques et en atténuant la réponse pro-inflammatoire (Li et al., 2006).

## **5.4 Implication des récepteurs TAM en oncologie**

Comme tous les récepteurs tyrosine kinase, les récepteurs TAM jouent des rôles importants dans la croissance et la différenciation cellulaires et, comme la plupart d'entre eux, ils sont impliqués dans le développement de divers cancers. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence leur activation incontrôlée suite à des mutations, des amplifications géniques, des clivages protéolytiques et des défauts d'expression. Chacun des trois récepteurs TAM a été initialement cloné à partir de cellules cancéreuses et tous sont capables de transformer les fibroblastes NIH3T3 et les lymphocytes BaF3 *in vitro* (Georgescu et al., 1999; Lan et al., 2000; Ling and Kung, 1995).

### **5.4.1 Mer :**

La plupart des mutations géniques de ces récepteurs sont décrites pour le récepteur Mer conduisant à un phénotype de dégénérescence rétinienne (D'Cruz et al., 2000; Gal et al., 2000; McHenry et al., 2004; Tada et al., 2006; Tschernutter et al., 2006). Cependant, pour les récepteurs TAM humains, aucune mutation activatrice associée au développement tumoral n'a été reportée jusqu'à présent. L'expression aberrante de Mer a été associée aux leucémies lymphoblastiques B et T, aux lymphomes (Ek et al., 2002), aux mélanomes (Gyorffy and Lage, 2007; Quong et al., 1994), aux rhabdomyosarcomes (Khan et al., 1999), à l'adénome pituitaire (Evans et al., 2001), au cancer gastrique (Wu et al., 2002), et au cancer de la prostate (Wu et al., 2004).

### **5.4.2 Axl :**

Axl a été initialement identifié comme un gène transformant dans des leucémies myéloïdes humaines et capable de transformer les fibroblastes murins NIH3T3 (O'Bryan et al., 1991; Rescigno et al., 1991). Le processus de transformation des cellules NIH3T3 paraît davantage lié à la surexpression d'Axl (Burchert et al., 1998). Une surexpression d'Axl a été rapportée dans les cancers du poumon (Shieh et al., 2005; Wimmel et al., 2001), de l'utérus (Sun et al., 2003), du sein (Berclaz et al., 2001), (Meric et al., 2002; Tavazoie et al., 2008; Zantek et al., 2001), de l'ovaire (Macleod et al., 2005; Sun et al., 2004), de l'estomac (Lin et al., 1999; Wu et al., 2002), du colon (Craven et al., 1995), de la prostate (Jacob et al., 1999; Mahajan et al., 2005; Sainaghi et al., 2005; Wu et al., 2004), de la thyroïde (Ito et al., 2002; Ito et al., 1999; Tanaka et al., 1998), du foie (Tsou et al., 1998), le carcinome rénal cellulaire (Chung et al., 2003), les leucémies myéloïdes aiguës et chroniques (Challier et al., 1996; Liu et al., 1988; Neubauer et al., 1994; Rochlitz et al., 1999), érythroïdes (Challier et al., 1996) et mégacaryocytiques (Challier et al., 1996), les mélanomes (Gyorffy and Lage, 2007; Quong et al., 1994; van Ginkel et al., 2004), l'ostéosarcome (Nakano et al., 2003), et le glioblastome (Vajkoczy et al., 2006).

### **5.4.3 Tyro-3 :**

La surexpression de Tyro-3, initialement cloné à partir de la lignée cellulaire leucémique myéloïde K562, (Dai et al., 1994) est associée à la tumorigenèse (Taylor et al., 1995). Une surexpression de Tyro3 est fréquemment observée dans des leucémies myéloïdes (Crosier et al., 1995) et le myélome multiple (De Vos et al., 2001).

## **5.5 Rôle des récepteurs TAM dans les différents mécanismes de l'oncogénèse**

Hanahan et Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000) ont proposé six mécanismes cellulaires essentiels à la progression tumorale : l'autosuffisance en facteurs de croissance, l'insensibilité aux inhibiteurs de croissance, le potentiel répliatif illimité, la métastase et l'invasion tissulaire, l'angiogenèse soutenue, l'apoptose et l'évasion. L'ensemble des études de la

littérature démontre que les récepteurs TAM contribuent au moins à trois de ces mécanismes fondamentaux de la cancérogenèse.

### **5.5.1 La migration et l'invasion tissulaire**

La migration cellulaire est modulée par les récepteurs TAM, qui sont impliqués dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, la morphologie cellulaire, la migration et l'invasion tissulaire. Dans le glioblastome, la surexpression d'Axl contribue à la motilité, cellulaire, qui est inhibée par un dominant négatif d'Axl (Axl-DN) dépourvu du domaine kinase du récepteur (Vajkoczy et al., 2006).

Outre leurs domaines kinases, les domaines extracellulaires des récepteurs TAM contiennent des motifs d'adhésion suggérant qu'ils pourraient être impliqués dans les contacts cellulaires. La surexpression d'Axl murin dans les cellules d'insecte entraîne une agrégation cellulaire (Bellosta et al., 1995). *In vitro*, les cellules n'exprimant pas Axl ne forment pas d'agrégats contrairement à celles qui l'expriment. Toutefois, la surexpression de Axl humain seul dans une lignée cellulaire leucémique mammaire (32D) ne suffit pas pour induire l'agrégation cellulaire ; l'addition de Gas6 est requise pour induire cette agrégation et cet effet est bloqué par l'ajout d'un excès de peptide ECD (ExtraCellular domain) (McCloskey et al., 1997).

L'expression de Axl n'induit pas un phénotype adhérent dans les cellules de cancer de poumon à petites cellules, mais corrèle avec l'adhérence des cellules de lignées cancéreuses de poumon (Wimmel et al., 2001), suggérant que c'est l'adhésion cellulaire qui induit l'expression d'Axl et non l'inverse. Il est aussi suggéré que les ligands d'Axl (Gas6 et la protéine S) et la forme soluble d'Axl (sAxl), qui est présente à des niveaux élevés *in vivo*, sont impliqués dans ce processus d'adhésion cellulaire. En fait, sAxl pourrait lier la forme totale membranaire d'Axl permettant ainsi les interactions cellulaires avec la matrice extracellulaire. Cette théorie est confirmée par les expériences de Budagian et al. (Budagian et al., 2005) montrant l'induction de la phosphorylation d'Axl et de la PI3K suite à la liaison à Axl-Fc. Axl est impliqué dans la migration normale des neurones GnRH de la plaque olfactive jusqu'à l'hypothalamus (Allen et al., 2002). D'une manière intéressante, son expression sur les cellules disparaît une fois que les cellules arrivent au site de migration finale.

Ainsi, la surexpression des récepteurs TAM pourrait contribuer à augmenter la migration des cellules cancéreuses et l'invasion des tissus.

### **5.5.2 L'angiogenèse**

L'angiogenèse est un processus physiologiquement limité chez l'adulte, observé notamment au niveau de la muqueuse utérine, lors des cycles reproductifs chez la femme, et lors de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins après une blessure. L'angiogenèse, en physiopathologie, constitue en revanche l'un des mécanismes importants du développement tumoral. Dans la littérature, Axl intervient dans l'angiogenèse tumorale, tandis que Tyro-3 et de Mer jouent un rôle plus secondaire. Deux types cellulaires sont impliqués chez l'homme : les cellules vasculaires musculaires lisses (CVMLs) et les cellules endothéliales de la veine ombilicale (HUVECs).

Gas6 exogène (rhGas6) augmente la prolifération et la migration des CVMLs, qui elles mêmes expriment la protéine Gas6 d'une manière endogène (Fridell et al., 1998; Nakano et al., 1995). Cet effet est bloqué par le domaine extracellulaire d'Axl, Axl-ECD. De plus, cette même étude a souligné l'importance de l'activité kinase d'Axl dans la migration des CVMLs qui est réduite de 50% par la surexpression d'un mutant d'Axl ayant un domaine kinase inactif, tandis qu'elle est augmentée de 2 à 5 fois par la surexpression de la forme sauvage d'Axl. Ces résultats suggèrent que la migration des CVMLs corrèle avec l'activation d'Axl induite par son ligand Gas6. D'autre part, l'effet anti-apoptotique d'Axl sur les CVMLs (Melaragno et al., 2004) lui permet de jouer un rôle important dans le remodelage vasculaire suite à une diminution du flux sanguin (Korshunov et al., 2006). De fait, les souris Axl<sup>-/-</sup> présentent une réduction de l'épaisseur de la paroi vasculaire (intima/media) au niveau de la carotide.

La migration des HUVECs est également régulée par Axl, selon l'étude du criblage génétique établie par Holland et al. 2005. Ils ont étudié par la suite les rôles fonctionnels d'Axl et de Gas6 dans la migration des HUVECs et ont trouvé que l'inhibition de leur expression réduisait significativement la migration cellulaire. D'autre part, la surexpression de la protéine Axl sauvage (mais pas Axl muté avec domaine kinase inactif) augmente la croissance cellulaire des HUVECs et la formation tubulaire endothéliale. L'expression d'Axl est sur-réglée dans les CVMLs des vaisseaux sanguins en cours de développement (O'Donnell et al., 1999). De plus, la signalisation de Gas6-Axl joue un rôle clé dans la stimulation de la migration, de la prolifération et de la survie des cellules endothéliales, facilitant ainsi l'angiogenèse. Axl induit la cytokine protumorigénique interleukine-8 (IL-8) et, dans un modèle de xélogreffe de cellules de cancer du sein (MDA-MB-231), l'expression d'Axl semble être nécessaire à la stimulation de la croissance tumorale et de l'angiogenèse *in vivo*, (Holland et al., 2005), potentiellement via l'induction de la sécrétion locale de cytokines.

Des études *in vivo* menées par l'équipe de Vajkoczy (Vajkoczy et al., 2006) ont également souligné le rôle important d'Axl dans l'angiogenèse et démontré que l'inhibition de la signalisation d'Axl supprimait partiellement la migration des cellules de gliomes, dans des modèles de xénogreffes de tumeurs humaines chez le rat et la souris (Vajkoczy et al., 2006). Il a été montré qu'Axl et Gas6 étaient surexprimés dans les cellules des vaisseaux sanguins tumoraux, dans les glioblastomes multiformes (Hutterer et al., 2008). D'une manière intéressante, cette co-expression n'a pas été retrouvée dans les vaisseaux des tissus non tumoraux adjacents suggérant l'implication potentielle d'Axl et Gas6 dans la néo angiogenèse de ces tumeurs.

### **5.5.3 La survie cellulaire et la croissance tumorale**

Les récepteurs TAM fonctionnent de différentes manières pour promouvoir la survie et la prolifération cellulaires dans des conditions normales et pathologiques, avec un découplage entre induction de la prolifération et effet anti-apoptotique dans les différents modèles (Sainaghi et al., 2005; van Ginkel et al., 2004).

Les principales études concernant le récepteur Mer montrent que celui-ci induit la survie en inhibant le suppresseur de tumeurs Wwox. Il a été suggéré que la stimulation de Mer dans l'adénocarcinome de la prostate activait les voies de signalisation de survie mais aussi inhibait les voies pro-apoptotiques (Mahajan et al., 2005).

L'expression anormale des récepteurs TAM et de leur ligand contribue à la croissance tumorale dans les cancers gastro-intestinaux, le cancer de l'œsophage, le cancer gastrique et le cancer du colon (Craven et al., 1995; Lin et al., 1999; Nemoto et al., 1997; Wu et al., 2002). Dans le cancer gastrique, la co-expression de Axl et Gas6 a été démontrée dans les tissus cancéreux gastriques humains ainsi que dans les lignées cellulaires suggérant qu'ils contribuent au développement et à la progression tumorale d'une manière autocrine, par le biais d'une activation de la voie PI3K/Akt induisant la survie cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (Sawabu et al., 2007). Cette observation est corroborée par des études antérieures soulignant le rôle de la signalisation de Gas6-Axl dans l'inhibition de l'apoptose plutôt que dans la stimulation de la prolifération (Bellosta et al., 1997; O'Donnell et al., 1999).

Cependant, Tyro-3 peut emprunter la voie de la PI3K/Akt afin de stimuler la prolifération cellulaire. En effet, il a récemment été démontré que l'aptitude de Tyro-3 à transformer les cellules et à induire leur prolifération faisait intervenir la voie de la PI3 Kinase. Ainsi, suite à

son activation par le ligand, Tyro-3 interagit avec la sous-unité p85 de la PI3K et stimule la prolifération des cellules NIH3T3 (Lan et al., 2000).

## 5.6 Interaction Axl Tyro 3

L'analyse du phénotype des souris Tyro3<sup>-/-</sup> et Axl<sup>-/-</sup> a permis de montrer le rôle important d'Axl et moins de celui de Tyro-3 dans la migration des neurones GnRH suite à une induction par leur ligand Gas6, à l'aide des expériences de migration dans des « transwell ». De cette étude, est émise l'hypothèse d'hétérodimérisation de Tyro-3 avec Axl, étant donné que l'expression de Tyro-3 et de Mer et non d'Axl dans les neurones GnRH GT1-7, ne suffit pas pour stimuler la migration neuronale suite à une induction par Gas6. Il est donc suggéré que le potentiel de Tyro-3 à induire une migration neuronale est lié à son hétérodimérisation avec Axl. Cependant, l'implication de Tyro-3 dans la protection des cellules neuronales GnRH contre l'apoptose était plus importante que celle d'Axl. L'ensemble de ces résultats souligne les rôles complémentaires de Tyro-3 et d'Axl dans la modulation de la survie et la migration des cellules neuronales GnRH, afin d'assurer des fonctions vitales comme la reproduction.

## Objectifs de notre travail de thèse

L'ensemble des études rapportées dans cette synthèse bibliographique reflète les progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes de tumorigenèse des sarcomes, qui permettent de les classer selon les anomalies moléculaires spécifiques qui les pilotent et les caractérisent permettant notamment une classification nosologique précise. Certains sous-types présentent des altérations moléculaires impliquant les récepteurs tyrosine kinases, notamment des translocations ou des mutations activatrices. Des agents thérapeutiques ciblés se sont montrés efficaces contre certains sous-types histologiques de sarcomes, comme l'exemple de l'imatinib ciblant le récepteur tyrosine kinase KIT dans les tumeurs stromales gastro-intestinales (GISTs).

*L'objectif initial de notre travail était d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans les sarcomes*, en nous focalisant sur les sarcomes à génétique complexe, pour lesquels aucune anomalie moléculaire caractéristique n'a pu encore être identifiée. Nous avons choisi comme modèles initiaux les léiomyosarcomes, les GISTs et les synovites villonodulaires pigmentées.

Pour des motifs de disponibilité de matériel et de délai à l'activation d'essai clinique, nous nous sommes concentrés sur le premier groupe de tumeurs pour la caractérisation de nouvelles cibles, et avons travaillé sur le modèle des GISTs à l'analyse de propriétés fonctionnelles du récepteur KIT muté dans un modèle cellulaire hybride.

La stratégie que nous avons choisie pour identifier de nouvelles cibles est celle d'une approche protéomique, destinée à repérer des protéines et phosphoprotéines de signalisation exprimées de façon différentielle entre le tissu sain (muscle lisse utérin) et la tumeur choisie, en l'occurrence le léiomyosarcome. Nous avons pu identifier plusieurs cibles d'intérêt et avons analysé plus particulièrement le rôle d'un des membres de la famille des récepteurs TAM, le récepteur Tyro-3, et celui de son ligand Gas6.

Nous avons en parallèle examiné le rôle des mutations dans la biologie des GISTs, et nous avons montré que ces mutations ne conduisent pas seulement à l'activation constitutive du récepteur, mais aussi à une rétention intracellulaire d'une forme immature de KIT présente dans les compartiments intracellulaires dans un état actif.

Nous montrerons les mécanismes mis en jeu dans l'activation des voies de signalisation de KIT et Tyro-3 dans les deux modèles que sont les léiomyosarcomes et les GISTs.



# Résultats

# **Article 1 : (en cours de soumission)**

## **Protein expression profile in leiomyosarcomas: a potential autocrine role for Tyro3 and Gas6**

Hiba El Sayadi, Daniel Pissaloux, Laurent Alberti, Severine Tabone- Eglinger, Dominique Ranchere, Anne Valérie Decouvellaere, Eric Tabone, Isabelle Ray-Coquard, Jérôme Fayette, Christophe Caux, Jean-Yves Blay

### Contexte de l'étude :

Les léiomyosarcomes (LMS) sont des tumeurs conjonctives qui se développent à partir des cellules musculaires lisses. Ce sont des tumeurs le plus souvent agressives ayant un fort potentiel métastatique. Elles sont associées à une faible survie globale des patients après le diagnostic de métastases, avec une médiane à 12 mois, et moins de 5% des patients en vie à 5 ans (Blay et al., 2003). Il s'avère important de développer de nouvelles thérapies basées sur les propriétés physiopathologiques et moléculaires des léiomyosarcomes.

La pathogenèse des léiomyosarcomes reste cependant mal élucidée malgré les nombreuses études analysant les anomalies génétiques de ces tumeurs. Ces études montrent qu'il existe une grande variabilité d'altérations moléculaires au sein de ces tumeurs, contrairement aux sous-types homogènes de sarcomes comme les synovialosarcomes et les tumeurs stromales gastro-intestinales. Les léiomyosarcomes sont donc probablement des tumeurs hétérogènes, dans lesquelles des sous groupes moléculaires restent à identifier.

L'application des technologies utilisant des puces d'ADN à l'échelle génomique a permis le développement de biomarqueurs des sarcomes de tissus mous et ainsi l'identification de plusieurs cibles intéressantes (Nielsen et al., 2002) (Segal et al., 2003). Cependant, ce type d'analyse n'est pas suffisant pour détecter les anomalies structurales des gènes ni les modifications post-transcriptionnelles, post traductionnelles, ou les mutations des protéines. D'autre part, plusieurs études ont montré une discordance entre l'expression de l'ARNm et celle de la protéine (Chen et al., 2002) (Varambally et al., 2005). Ces difficultés peuvent être contournées par l'utilisation des approches protéomiques qui analysent le produit final protéique et sont désormais facilitées par le développement récent des puces protéiques, marquant le début de l'ère post-génomique. Ces analyses de profils d'expression protéique, contrairement à celles du transcriptome ou du génome, pourraient refléter davantage le comportement de la cellule, permettant ainsi de mieux comprendre la biologie des tumeurs.

Plusieurs études utilisant ces approches protéomiques ont permis d'établir de nouvelles classifications moléculaires et d'identifier des biomarqueurs aidant au diagnostic du cancer du poumon {Chen, 2003 58 /id;} (Yanagisawa et al., 2003), du cancer de l'ovaire (Alaiya et al., 2002), du cancer du sein (Dwek and Alaiya, 2003), (Reyzer et al., 2004), des leucémies (Cui et al., 2004) et du cancer de la prostate (Varambally et al., 2005). Parmi ces biomarqueurs se trouvent les protéines kinases, protéines clés de communication et de contrôle dans les cellules. Elles régulent la croissance cellulaire, les réponses métaboliques, la prolifération, la migration et l'apoptose (Schlessinger and Ullrich, 1992). L'altération de leurs fonctions est impliquée dans plus de 400 pathologies humaines, incluant le cancer, les maladies cardiovasculaires, le diabète et l'inflammation, ce qui leur confère une grande importance dans le diagnostic et le traitement de ces maladies.

Pour étudier les anomalies moléculaires impliquant l'expression ou l'activation des kinases, dans les léiomyosarcomes, nous avons examiné la régulation de 240 protéines kinases et de 110 protéines de signalisation régulant la prolifération, le stress et l'apoptose, grâce à un large screening de protéines utilisant les puces d'anticorps (Kinex KAM-1.1). L'objectif est d'identifier des kinases surexprimées dans les tumeurs par rapport au tissu musculaire lisse normal et d'étudier leurs rôles fonctionnels sur des lignées cellulaires de léiomyosarcome.

### Résumé de l'étude :

Ce criblage a été réalisé sur une première série de 13 échantillons de léiomyosarcomes congelés, provenant de localisations anatomiques variées, comprenant l'épaule, le rétro-péritoine, les membres supérieurs et inférieurs, la paroi abdominale, le tronc, le bassin, et l'utérus. Un échantillon de muscle lisse utérin normal a été utilisé en tant que tissu sain de référence.

Les protéines extraites des échantillons ont été analysées sur des puces à anticorps (Kinex Antibody Microarray) (Kinexus, Vancouver, Canada). Les expériences d'hybridation sont réalisées en plusieurs étapes successives. Les lysats protéiques sont tout d'abord liés à des sondes fluorescentes, puis hybridés sur les puces contenant 652 anticorps spécifiques en duplicats. Des étapes de lavage permettent ensuite d'éliminer les protéines non liées sur les cibles. Enfin, les signaux fluorescents sont quantifiés par imagerie, chaque signal reflétant la quantité de protéine liée à l'anticorps et donc son niveau d'expression ou de phosphorylation.

Les valeurs brutes obtenues après soustraction du bruit de fond local ont été filtrées afin d'éliminer les données non reproductibles entre duplicates, celles qui ne sont jamais différentiellement exprimées, celles qui sont dans le bruit du fond ou toujours faiblement exprimées. Ainsi, nous avons conservé 192 protéines dont l'expression variait au moins une fois d'un facteur de 2 entre échantillons et tissu sain de référence. Parmi celles-ci, la protéine FAK est constamment retrouvée non phosphorylée sur le résidu Y397, tandis que Tyro-3, PKC theta et MSH2 ont été retrouvés significativement surexprimés dans les LMS. D'autres protéines ont été retrouvées significativement sur ou sous-exprimées dans les LMS par rapport au tissu musculaire lisse normal

Nous avons procédé par la suite à une classification non supervisée (clustering) des 192 protéines sélectionnées dans le but de différencier d'éventuels sous-groupes de léiomyosarcomes. Cette analyse a permis de mettre en évidence que les léiomyosarcomes pouvaient être classés en deux groupes distincts en fonction de leurs profils d'expression protéiques respectifs. Nous avons pu alors identifier les protéines les plus discriminantes entre ces deux groupes. Celles-ci comprennent les formes phosphorylées de 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1) et de BLNK (B cell linker), et l'expression de CASP2 (caspase 2) et ALK (Anaplastic lymphoma kinase). Ce travail de classification sur une base protéomique est en cours de validation sur une série indépendante de 30 LMS.

Tyro-3, un récepteur tyrosine kinase oncogénique de la famille des récepteurs TAM, avec Axl et Mer, nous a particulièrement intéressés du fait de son rôle potentiel dans la biologie cellulaire maligne. En effet, l'expression de Tyro-3 a été trouvée dans diverses lignées cellulaires leucémiques et dans les blastes de 6 sur 11 patients atteints de leucémie myéloïde aiguë analysés (Crosier et al., 1995) ; sa surexpression est aussi révélée dans les cellules de myélome comparé aux cellules lymphoblastoïdes B autologues (De Vos et al., 2001). Aucun rôle de Tyro-3 (ou d'Axl et Mer) n'a été préalablement décrit dans les léiomyosarcomes, ce qui nous a incités à étudier sa voie de signalisation et son rôle fonctionnel dans des lignées de LMS : SK-LMS-1 et CNIO AA.

D'une manière intéressante, nous avons identifié la présence du ligand de Tyro-3, Gas6, dans 8 des 13 échantillons tumoraux étudiés, suggérant une boucle autocrine potentielle dans certaines de ces tumeurs. De manière importante, nous retrouvons une corrélation entre la co-expression de Tyro-3 et de son ligand Gas6 et la phosphorylation d'Akt dans les tumeurs et les deux lignées LMS et, à un moindre degré, la phosphorylation des MAPK Erk1/2. Nous soulignons que la protéine Gas6 n'était pas analysée dans l'array Kinexus. La perte de

phosphorylation de FAK Y397 se trouve aussi dans la lignée CNIO AA exprimant fortement Gas6. Inversement, la lignée SK-LMS-1 exprimant de faibles taux de Gas6 exprime FAK phosphorylé au Y397. *In vitro*, l'addition de Gas6 recombinant à la lignée SK-LMS-1 induit la phosphorylation d'Akt et la diminution de la phosphorylation de FAK Y397. L'inhibition combinée de l'expression des gènes Tyro-3 et Axl par des siRNA dans la lignée CNIO AA réduit significativement la viabilité de celle-ci, ce qui suggère l'implication d'une boucle autocrine de Tyro-3 et Gas6 dans la prolifération et la survie des cellules de léiomyosarcomes. L'expression de Gas6 et le profil protéomique vont être analysés sur une plus large cohorte de tumeurs, par la double approche Kinexus et les microarrays de tissu (TMAs).

## Conclusion

Ces résultats apportent donc de nouvelles connaissances sur la biologie des léiomyosarcomes et suggèrent un rôle de Gas6 et Tyro-3 dans ces tumeurs, à travers une boucle de croissance autocrine. Ces travaux permettront de poser les bases conceptuelles pour évaluer l'utilisation des inhibiteurs tyrosine kinase ciblant Tyro-3/Axl dans les léiomyosarcomes.

# Protein expression profile in leiomyosarcomas: a potential autocrine role for Tyro3 and Gas6

Hiba el Sayadi <sup>1,3</sup>, Daniel Pissaloux <sup>2,3</sup>, Laurent Alberti <sup>1</sup>, Severine Tabone- Eglinger <sup>1</sup>,  
Dominique Ranchere <sup>2</sup>, Anne Valérie Decouvelaere <sup>2</sup>, Eric Tabone <sup>2</sup>, Isabelle Ray-Coquard <sup>4</sup>,  
Jérôme Fayette <sup>4</sup>, Christophe Caux <sup>1</sup>, Jean-Yves Blay <sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Equipe Cytokines et Cancers, INSERM U590, Centre Léon Bérard – Lyon, France.

<sup>2</sup> Service d'anatomie pathologique, Centre Léon Bérard - Lyon, France.

<sup>3</sup> Université Claude Bernard Lyon 1 Lyon, France.

<sup>4</sup> Département de Médecine Centre Léon Bérard

## Correspondance:

Jean-Yves Blay, MD, PhD

Centre Léon Bérard - Equipe Cytokines et Cancers

28 rue Laënnec - 69373 Lyon cedex 08 - FRANCE

[blay@lyon.fnclcc.fr](mailto:blay@lyon.fnclcc.fr) / Tel: (33) 4 78 78 71 38 / Fax: (33) 4 78 78 27 20

**Running Title:** Tyro3, Gas6 and FAK expression in leiomyosarcomas

**Key Words:** leiomyosarcomas, tyrosine kinase, Tyro3, Gas6, FAK.

**Grant Support:** Hiba El Sayadi received a grant from CONTICANET Network of Excellence FP6-018806. JY Blay received Research Grant from Novartis. This work was supported in part by grants from Association pour la Recherche sur le Cancer, Ligue contre le Cancer (Comité de l'Ain et Comité du Rhône), the Breast Cancer Research Foundation, Institut National du Cancer, and Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône Alpes, le Prix Lucien Tartois.

## **Abstract**

### **Introduction:**

Soft tissue and visceral leiomyosarcoma (LMS) account for 15% of all sarcomas in adults. Molecular alterations in LMS are not well characterized, with often complex gains and losses of chromosome segments. We investigated the expression or phosphorylation of tyrosine kinases and downstream signalling molecules in a series of fresh frozen LMS and cell lines with the aim to identify potential targets for targeted therapy.

### **Material and methods**

13 fresh frozen samples of soft tissue and visceral LMS were analyzed and compared with normal smooth muscle uterine tissue (NSM). All patients gave consent to the use of biological material. Proteins were extracted from the samples and submitted to an analysis using an antibody microarray (Kinexus). An unsupervised clustering was performed on the 192 proteins selected according to the manufacturer's recommendations to distinguish the LMS tumors from the NSM and to categorize them according to protein expression profiles. Four proteins were found differentially expressed including Tyro3, a receptor tyrosine kinase. The functional activity of Tyro3 was investigated in 2 LMS cell lines, SK-LMS-1 and CNIO AA

### **Results:**

Four proteins and phosphoproteins were found differentially expressed in LMS samples as compared to NSM: an hypophosphorylation of FAK Y397 was observed in all samples while Tyro3, MSH2, and PKC theta were found overexpressed in LMS samples as compared to the normal tissue. An unsupervised hierarchical clustering identified 2 subsets of leiomyosarcomas, on the basis of the differential expression of 4E-BP1 phosphorylated S65 BLNK phosphorylated Y84, CASP2, and ALK. Gas6, the major ligand of Tyro3 was found expressed in 8 of the 13 samples, and the co expression of Gas6 and Tyro3 was found exclusively associated with the expression of a phosphorylated Akt, and to a lesser extent to the presence of Erk1/2 phosphorylation. No correlation between Gas6 expression and clinical presentation or outcome was found. Both SK-LMS-1 and CNIO AA LMS cell lines were found to express Tyro3, while Gas6 expression was only observed in CNIO AA cells. Phospho Akt was expressed spontaneously in CNIO AA, but not in SK-LMS-1, while the opposite figure was observed for phosphorylated FAK Y397. Exposure of SK-LMS-1 to exogenous Gas6 induced phosphorylated Akt, and resulted in a reduction of FAK Y397

phosphorylation. Transfection of CNIO AA with siRNA directed against, Tyro3 and Axl genes induced a reduction of the expression of the specific proteins, and when combined, significantly reduced CNIO AA cell viability.

**Conclusion:**

LMS are characterized by a reduction of FAK Y397 phosphorylation and an over expression of PKC theta and Tyro3. Gas 6 a ligand of Tyro3 is expressed in a subset of LMS tumors and cell lines, and may exert autocrine activities in a subset of leiomyosarcomas.



# 1. Introduction:

Leiomyosarcomas (LMS) is one of the most frequent subtypes of sarcomas of adults, accounting for 15% of all soft tissue and visceral sarcomas (1-4). The primary sites of soft tissue LMS are located on the lower limbs or the trunk mainly in the retroperitoneum. Leiomyosarcomas may also occur on visceral sites, particularly in the uterus (3). Despite their heterogeneous clinical presentations, the management of LMS, as for other soft tissue and visceral sarcomas, is based on a complete surgical excision of the tumor followed or preceded by radiotherapy on the tumor bed (5). Still, a substantial proportion of LMS patients relapse and die from their disease, with a median survival of 12 months after metastatic relapse, and few long term survive (6,7).

Cytotoxic treatments have a limited efficacy in leiomyosarcomas in vivo in man (6). Advanced or metastatic LMS remain one of the soft tissue sarcoma subtypes with the worst outcome, in particular for trunk sites (6). Doxorubicin containing regimen in first line provides a 15% response rate and a 20% 6 months PFS rate according to the STBSG database (6). In second line, trabectedin (8), the gemcitabine docetaxel combination (9,10), and anti-angiogenic agents (11) may also be efficient in some of these patients. However, in the absence of a known mutation encoding for a druggable molecular alteration, e.g. like KIT mutations in GIST (12), no targeted therapy has been reported to exhibit high level of activity in leiomyosarcomas so far.

Leiomyosarcomas exhibit complex genomic alterations, and different types of gains and losses have been recently described, pointing out the presence of possible different nosological entities among this group of tumors (13-18). In this context, it would be useful to identify potential “driver” genes in these tumors, in particular genes providing positive signal such as tyrosine kinase receptors or molecules involved in signal transduction.

The identification of altered expression or phosphorylation patterns in protein kinases may guide the identification of novel targets in these diseases. The objective of the present work was to investigate the presence of abnormal phosphorylation patterns of tyrosine kinases or downstream signalling molecules expression in leiomyosarcomas cell lines and fresh frozen tumor samples to screen for possible druggable targets. In this process several kinases, and phosphokinases were found differentially expressed between LMS tumors and the normal tissue. We report here that Tyro3, its ligand Gas6, and the related tyrosine kinase receptor Axl are expressed and activated in a subset of LMS cell lines and fresh tissues.

## 2. Materials and Methods

### **Cell lines and tumor samples.**

The SK-LMS-1 leiomyosarcoma cell line was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA), while the CNIO AA cell line was obtained from Pharmamar (Tres Cantos, Spain). The thirteen fresh frozen samples of LMS and the normal smooth muscle uterine tissue sample analyzed in this work were collected from the Centre Léon Bérard and the virtual ConticaBase tumor bank, All patients gave a written consent to the use of biological material according to the current legislation in France.

### **Protein preparation for Kinex™ antibody microarrays.**

Tumors and normal tissues were grinded in liquid nitrogen and suspended in lysis buffer (20 mM MOPS, pH 7.0, 2mM EGTA, 5 mM EDTA, 30 mM sodium fluoride, 60 mM  $\beta$ -glycero-phosphate, 20 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethyl-sulfonylfluoride, 3 mM benzamidine, 5  $\mu$ M pepstatin, 10  $\mu$ M leupeptin, 1 % Triton X-100, and 1 mM dithiothreitol) for 30 min at 4°C. The lysates were then centrifuged at 13000 rpm at 4°C and the amount of proteins in the supernatant fraction was quantified using the Bio-Rad Dc Protein Assay (500-0113-0114-0115).

### **Kinex™ antibody microarray analysis.**

The experiment was performed by Kinexus Bioinformatics Corporation (Vancouver, BC, Canada) as follows: tumor or normal tissue proteins are tagged with a fluorescent dye, then incubated with the antibody microarray. Target proteins are captured by specific antibodies immobilized on the microarray, and unbound proteins are washed away. Captured proteins are quantified according to the amount of dye signal within each spot. For this study, Kinex™ Service use the KAM-1.1 chip allowing the analysis of two samples per chip and containing over 650 antibodies each spotted in duplicate. Antibodies are directed against 240 protein kinases, 28 phosphatases and 90 other cell signalling proteins that regulate cell proliferation, stress and apoptosis, for a total of 630 proteins tested (Kinexus, Vancouver Canada)..

### **Statistical analysis of proteomic arrays.**

Excel spreadsheets containing raw data, i.e. spot signal and local background intensities were provided by Kinexus, as results for the hybridization experiments and for each microarray. Duplicate values were averaged, and samples were normalized by the mean, first in an intra-slide way (by pairs) to enable direct comparison between samples, then in an inter-slide way to compare data derived from samples that had been assayed on different slides within the same Kinexus batch. The raw intensity data coming from the 14 samples (13 LMS and 1 uterine smooth muscle as a control) were normalized on an Excel sheet according to Kinexus recommendations. Data of insufficient quality were then removed, upon manufacturer's recommendations by applying the following filters: 1) the normalized intensities should be above 500 in at least one sample. 2) The signal/noise ratio should be above 1.5. 3) In addition, mean values resulting from non consistent duplicates were discarded when the error range was above 15%. 4) Finally, to keep only the most discriminant antibodies,  $\text{Log}_2$  (ratio) values between samples were calculated and the antibodies that had a two-fold change ( $|\text{Log}_2$  (ratio)  $>1$ ) at least one time were selected. An unsupervised clustering was then performed on the remaining 192 proteins selected, after a z-score transformation. This protein-list was also used for all further statistical analysis. To distinguish the best markers of differentiation between the 2 expression groups, we always used a t-test with a p-value  $<0.05$ .

### **Western blot analysis.**

Tumors or cells' samples were lysed in lysis buffer (20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L orthovanadate, 10 mmol/L NaF, 1 mmol/L PMSF, 0.5 Ag/mL leupeptin, 1 Ag/mL pepstatin, 10 IU/mL aprotinin, and 1% Triton X-100). Lysates were rocked for 30 min at 4°C, and then centrifuged to remove insoluble material. Supernatant protein contents were determined using Bio-Rad Dc Protein Assay (500-0113-0114-0115).. The normalized soluble proteins (supernatant fraction) were directly analyzed by SDS-PAGE Western blotting with antibodies of interest.

### **Analysis of Tyro3 and Gas6 interaction in CNIO AA cell line.**

The analysis of Tyro3 and Gas6 in the CNIO AA cell lines was performed using the Duolink assay (Uppsala, Sweden). Briefly, the two primary antibodies directed against Tyro3 and Gas6 recognize the two antigens of interest in the cells and are recognized by

two species-specific secondary antibodies (provided in the Duolink kit) each labelled with a different short DNA strand attached to it. When the secondary antibodies are in close proximity, the DNA strands can interact through the addition of two other circle-forming DNA oligonucleotides, which are then joined by enzymatic ligation. Upon addition of the amplification solution (containing nucleotides and polymerase), several hundred-fold replication of the DNA circle can subsequently occur, and fluorescent probes (added as Detection solution) highlight the product. The resulting high concentration of fluorescence in each single-molecule amplification product is easily visible as a discrete bright spot in a fluorescence microscope. Nuclei are counterstained with Dapi (blue).

#### **siRNA transfections.**

The siRNAs examined in this study were synthesized by Dharmacon, Inc (Lafayette, CO, USA). Each freeze-dried siRNA was reconstituted with RNase-free water to prepare a 20  $\mu$ M stock solution. Cells were transfected with the DharmaFECT 2 transfection reagent (Dharmacon) according to the manufacturer's instructions. To determine the efficiency of gene silencing, the whole cell lysates of the co-transfected cells was used for western blotting as described above and probed using specific antibodies for Gas6, Tyro3 and Axl.

#### **Cell titer Glo Viability assay (Promega).**

SK-LMS-1 and CNIO AA leiomyosaromas cells were plated in duplicate in 96-well plates (625 cells/well and 2000 cells/well respectively). The day after plating, the media was replaced by media containing either non-targeting siRNA (Dharmacon), either siRNA directed against Gas6, Tyro3, or Axl (Dharmacon), alone, in paired combinations or all together for 24, 48, and 72h. After these periods, relative numbers of viable cells were measured in comparison to the untreated control and the siRNA control (scramble) using the Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) according to the manufacturer's instructions.

#### **Sources of antibodies**

The following antibodies were used for the present study. Human Gas6 mouse monoclonal antibody: R&D systems (France), Human Dtk (Tyro3): goat polyclonal antibody: R&D systems (France), Phospho-Axl (Y779) rabbit polyclonal antibody: R&D

systems (France), Human Axl goat polyclonal antibody: R&D systems (France), Phospho-FAK (Y397) rabbit polyclonal antibody: abcam (France), FAK: Mouse monoclonal [12G4] antibody: abcam (France), phospho-Akt (Ser473) rabbit monoclonal antibody: Epitomics (France), Akt: rabbit polyclonal antibody (Cell signaling, France), P44/42 MAP kinase antibody: (Cell signaling), Phospho-p44/42 Thr 202/Tyr 204 MAP Kinase antibody, PTEN (138G6) rabbit monoclonal antibody: cell signaling (France), Beta-Actine: mouse monoclonal antibody (Sigma, France), GAPDH mouse antibody: (Biodesign, France)

### **Statistical analysis**

The comparison of viability rates between samples was performed with Student T test. The distribution of protein and phosphoprotein expression in the different groups were compared using a chi square Fisher's exact test.

## **3. Results:**

### **3.1. Protein expression distinguishing LMS vs normal uterine smooth muscle**

Among the 652 proteins and phosphoproteins tested, the expression of four proteins or phosphoproteins was found to differ most significantly between normal smooth muscle and the 13 fresh LMS tumor samples tested. All leiomyosarcoma cell lines and fresh tissues showed a down regulation of the phosphorylation of FAK on tyrosine 397 (Figure 1). Several other proteins were found underexpressed in the majority of LMS samples as compared to normal smooth muscle, in particular PKR1, and to a lesser extent CDK2, MEK1 and PP2A. Several proteins were found specifically over-expressed in LMS as compared to normal smooth muscle: the 3 most discriminant proteins were PKC theta, Tyro-3 and MSH2 all found over-expressed in fresh leiomyosarcomas samples compared to normal uterine muscle (Figure 1).

### **3.2. Two groups of leiomyosarcomas**

Unsupervised hierarchical clustering identified 2 groups of leiomyosarcomas on the basis of the Kinex proteomic array (Figure 2A). This clustering was found to be robust and not altered by the variations of the stringency of the different parameters (see materials and methods).

The expression of 4 proteins was found to be the most discriminant to distinguish the 2 groups of LMS: in the subgroup 1, S65 4E-BP1 and Y84 BLNK were found phosphorylated at the same level to that of normal smooth muscle while in group 2, no phosphorylation of these proteins on these sites was observed (Figure 2B). In addition, the overall expression of CASP2 and ALK was found diminished in tumors of group 2, as compared to group 1. The clinical characteristics of fresh tumors in group 1 and 2 were similar: histological grade, gender, tumor site, age, clinical outcome was not significantly different in these 2 subgroups (Table 1). As mentioned above, a consistent loss or down regulation of FAK Y397 phosphorylation was observed in LMS samples as compared to normal uterine smooth muscle. A different pattern of FAK phosphorylation was observed in the 2 above described LMS groups: a global loss of phosphorylation on all FAK sites was observed in group 2, while group 1 kept FAK phosphorylation, in particular on Y577 or Y910 (Figure 2C).

### **3.3. Tyro-3, Axl and Gas6 expression in leiomyosarcoma**

Tyro3 is one of the members of the family of transmembrane tyrosine kinase receptors, with a close similarity to the Axl and Mer receptors (19). Since Tyro3 was found to distinguish leiomyosarcomas cell lines and fresh tissues from normal smooth muscle cells, we investigated, in LMS cell lines and fresh tumor tissues, the expression of both Gas6, the ligand of Tyro3, and Axl, another receptor of the same family of proteins with important oncogenic properties.

The 140 kDa isoform of Tyro3 was found expressed at various levels in all the fresh LMS samples tested (Figure 3A), while the 120 kDa isoform was found detectable only in 8 of the 13 samples tested. No anti phospho-Tyro3 antibody was found available for Western blot analysis. Axl was found expressed and phosphorylated in 12 of the 13 samples, although at markedly variable levels across tumor samples (Figure 3A, Table1).

Gas6 was found expressed in 8 of the 13 tumors samples, and in the normal smooth muscle (Figure 3). Interestingly, phosphorylation of Akt on S473 was low (+) or non detectable (0) in tumors with low or undetectable Gas6 expression (5 of 5 vs. 0 of 8 tumors with Gas6++,  $p=0.0003$ ) (Figure 3A, Table 1). High levels of Erk1/2 phosphorylation were observed in 9 of the 13 tumors, including all but 1 of the Gas6-expressing tumors ( $\chi^2$ ,  $p=0.02$ ).

These 2 subgroups of LMS distinguished by the expression of Gas6 and phosphorylated Akt were different from the 2 LMS subgroups separated by unsupervised clustering by 4EBP1, Casp2, Alk and BLNK expression. Histological grade, gender, tumor site, age, clinical outcome were not significantly different in the Gas6 and /or P-Akt expressing groups (Table 1).

We then investigated the expression of Tyro3, Gas6, Axl and phospho- Axl, Akt and P-Akt, Erk1/2 and Phospho Erk1/2 in the two LMS cell lines, CNIO AA and SK-LMS-1 by western blot analysis (Figure 3B). CNIO AA expressed high levels of Gas6, Tyro3 and Axl , as well as phosphorylated Akt, and phosphorylated Erk1/2. Conversely, SK-LMS-1 expressed low levels of Gas6, and low levels of phosphorylated Akt and phosphorylated Erk 1/2. These two cell lines have therefore different expression patterns of Gas6, P-Erk and P-Akt, which match the two subgroups of fresh tumors distinguished by the expression pattern of Gas6.

### **3.4. Role of Tyro-3 and Gas6 in leiomyosarcoma**

To further investigate a putative Gas6/Tyro-3 autocrine pathway in leiomyosarcomas, we investigated the co-localisation of Tyro3, Axl and Gas6 in leiomyosarcomas cell lines, SK-LMS-1 and CNIO AA. As shown in figure 4A, Gas6 and Tyro3 colocalize in CNIO AA with a dot like pattern within the tumor cells (Figure 4A). This was also observed with Axl and Gas6, which also co-localize within the cells (Figure 4B). As expected, given the low level of Gas6 expression in SK-LMS-1, no co-localisation of Gas6 and its receptors was observed in this cell line (Figure 4C, 4D).

We then investigated the impact of the addition of Gas6 in the non Gas6-producing SK-LMS-1 cell line and the effect of the inhibition of Gas 6, Tyro3 and Axl with siRNA and antibodies in the Gas6-producing CNIO AA cell line.

The addition of exogenous Gas6 on SK-LMS-1 cell line induced an increase of the phosphorylation of Akt, in the absence of serum (Figure 5A) In the presence of serum, cell viability, evaluated by the Cell Titer Glo assay (see Material and methods) was not increased by the addition of Gas6 (Figure 5B). Cell viability of SK-LMS-1, decreased very significantly upon serum deprivation, but cell viability increased marginally after 24 and 48 hours of exposure to Gas6 (Figure 5C).

CNIO AA produces spontaneously high levels of Gas6 in western blot, (as well as in the supernatant (36pg/mL/10<sup>6</sup> cells/24h). Exposure to anti Gas6, and/or Tyro3, and/or Axl antibodies did not affect significantly cell viability or Akt phosphorylation (not shown).

Conversely, the combination of siRNA against Tyro3 and Axl, significantly reduced the expression of both proteins in cells (Figure 6A). Of note, Gas6 protein was reduced only transiently at 3h upon exposure to Gas6 siRNA (not shown). Tyro3 and Axl siRNA combination reduced cell viability of CNIO AA after 24, 48 and 72 hours of incubation (Figure 6B). In the condition of serum deprivation, a decrease of Gas6 expression (Figure 7). Of note, a reduction of Akt phosphorylation was observed in the serum deprived CNIO AA cell line, and exogenous Gas6 partially restored Akt phosphorylation in CNIO AA in these conditions (not shown)

### **3.5. FAK Y397 phosphorylation is modulated by Gas6**

We then explored the possible impact of Gas6 and Tyro3 signalling on the phosphorylation of FAK, in particular on Y397, whose downregulation is one of the hallmarks of LMS as compared to the normal smooth muscle cells (Figure 1). For SK-LMS-1, serum deprivation was found to induce an up regulation of Gas6, which was associated with a significant down regulation of FAK Y397 phosphorylation (Figure 7). Addition of Gas6 in serum deprived SK-LMS-1 does not reduce further FAKY397 phosphorylation (Figure 7). Conversely, for CNIO AA, serum deprivation was found to induce a loss of Gas6 which was associated with an up regulation of FAK Y397 phosphorylation; serum deprived CNIO AA cells exposed to exogenous Gas6 experienced a decrease of FAKY397 phosphorylation (Figure 7).



## 4. Discussion

In the present report, we identify a potential important role of the Tyro3 and Axl receptors tyrosine kinases and their ligand Gas6 in the biology of leiomyosarcomas, acting as inducers of Akt phosphorylation, modulating FAK phosphorylation, and promoting cell survival.

The initial goal of this project was to identify protein kinases and proteins of the transduction machinery overexpressed or specifically phosphorylated in malignant smooth muscle tumors as compared to the normal smooth muscle. The goal was to gain more understanding in the biology of this disease and to identify potential targets for therapeutic approaches. To this aim, we investigated the expression of a set of 652 proteins and phosphoproteins using the Kinex assay, and analyzed the expression profile to identify the most discriminant proteins distinguishing NSM and smooth muscle tumor cells.

Four proteins and phosphoproteins were found to be discriminant, using stringent parameters to reduce as much as possible false positive results. The most prominent downregulated phosphoprotein was actually FAK, whose Y397 was found very consistently hypophosphorylated in all the tumor samples tested. Conversely, three proteins were found significantly up regulated, Tyro3, PKC theta, and MSH2. The constitutional loss of MSH2 in patients with HNPCC may represent a risk factor for the development of sarcomas, and several sarcoma histotypes were reported to exhibit a down-regulation of MSH2 and MSH6 expression (20-23), so the significance of an over expression in these samples remains unclear and was not further studied in this report . On the other hand, PKC theta overexpression has already been found associated with specific histotypes of sarcomas, in particular GIST and PNET (24,25).

As of yet, the contribution of the Tyro3 protein had not been found associated with specific cancer types, even though the Axl/Tyro3 family of proteins may contribute to several aspect of neoplastic transformation and tumor progression.. The related Axl receptor tyrosine kinase is overexpressed in a variety of human tumors, including renal cell carcinoma, pancreatic cancer, glioblastoma, breast carcinoma, and correlated to a poor prognosis. Axl expression has also been found associated to the emergence of resistance to treatment (26-20). It was shown to be one of the target genes of the fusion proteins encoded by the fusion genes of the synovial sarcomas (31). However, no specific role of Tyro3 has been described in human cancers so far.

In protein array experiment, Tyro3 was found over expressed in LMS samples, and in western blot Tyro3 expression was found to be a consistent feature of all the 13 fresh LMS tumor cells as well as the 2 LMS cell lines tested in this study. Conversely, the related Axl receptor tyrosine kinase was not found consistently expressed in LMS tumour samples. It will be of interest to compare these findings with those obtained using different technologies, in particular CGH arrays to investigate whether down or up regulation of specific proteins are correlated with specific deletions or amplification of the chromosomal segments containing these genes.

Importantly Gas6 was found expressed in 8 of the 13 LMS fresh tumour samples and its expression was found completely correlated with Akt phosphorylation in these tumors. A similar observation was made in the CNIO AA cell line which coexpressed Gas6 and phosphorylated Akt at high levels, while SK-LMS-1 expressed little or no Gas6 and phosphorylated Akt. This is consistent with previous reports showing a role of the PI3K/Akt pathway in Tyro3 signalling (32).

The co-localisation of Tyro3 and Gas6 in the CNIO AA cell line confirmed the existence of a binding of the ligand to its receptor, suggesting an autocrine pathway in this cell line. Indeed, although siRNA directed against Gas6 induced only a transient blockade of Gas6 expression without a significant impact on Akt phosphorylation, in the condition of serum deprivation, a decrease of Gas6 expression along with a reduction of Akt phosphorylation was observed in the CNIO AA cell line. Exogenous Gas6 was found to be able to restore Akt phosphorylation in CNIO AA in these conditions.

A similar phenomenon was observed in the non Gas6 producing SK-LMS-1 cell line: the addition of exogenous Gas6 in culture induced a low yet significant induction of Akt phosphorylation, demonstrating the link between Gas6 and Akt phosphorylation in this leiomyosarcoma cell lines in agreement with what is observed in tumor tissues. Of note, we were unable to identify a subgroup according to primary site, grade, size, gender in this small series of patients, but this question needs to be addressed in a larger serie.

These results suggest therefore the existence of a Tyro3/Gas6 autocrine loop contributing to leiomyosarcoma cell proliferation and survival. Thus, we tested this hypothesis in the 2 LMS cell lines. Cell viability of the non Gas6 producing cell line SK-LMS-1 was not affected by the addition of exogenous Gas6 in the presence of serum. In the absence of serum, the SK-LMS-1 cell line experienced a dramatic decrease of cell viability, despite the induction of Gas6 proteins. The addition of exogenous Gas6 however marginally increased cell viability in these conditions.

For the Gas6 producing cell line, CNIO AA, antibodies directed against Gas6 or Tyro3 did not affect cell viability (not shown). siRNA directed against Tyro3 and Axl decreased significantly the expression of their respective protein, while Gas6 siRNA induced only a transient decrease of Gas 6 protein. In combination, siRNA against Axl and Tyro3 were found to reduce significantly cell viability in the cell line. Interestingly, this was observed more importantly with the combination of siRNAs, and not with single siRNA, pointing out possible heterodimerisations between Axl and Tyro3 in this cell line. Consistent with this hypothesis, both Axl and Tyro3 co localized with Gas6 in co-localisation experiments.

We observed a downregulation of FAK phosphorylation in leiomyosarcoma samples, in particular on the critical Y397 residue, as an important proteomic hallmark of leiomyosarcomas. This is in marked contrast with what is observed in carcinoma models and tumors (33): FAK Y397 is frequently observed in carcinoma cells, and correlates to prognosis in some tumor types. Interestingly, several lines of evidence indicate that the inhibition of FAK Y397 was in part induced by Gas6 in the 2 LMS cell lines tested in this study: 1°) serum starvation was associated with a reduced production of Gas6 by CNIO AA, along with an increase of FAKY397 phosphorylation. 2°) Exposure to exogenous Gas6 in CNIO AA reduced phosphorylation levels of FAK Y397 in these conditions; 3°) Conversely, in SK-LMS-1, serum starvation induced an up regulation of Gas6 and a reduction of the FAK Y397 phosphorylation.

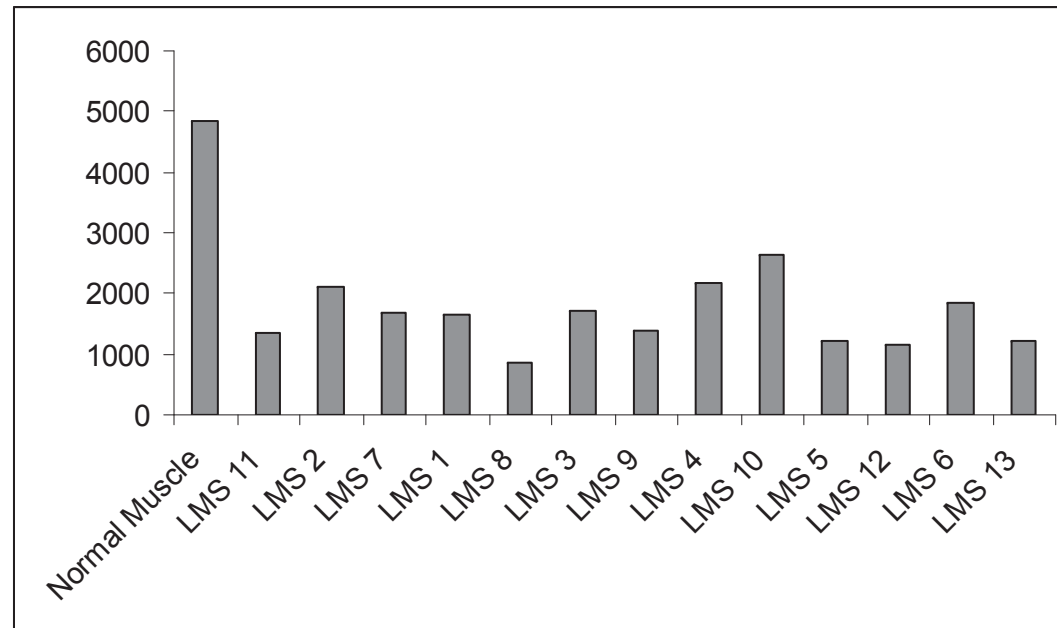
The significance of this specific downregulation of Y397 phosphorylation of FAK in leiomyosarcomas remains unclear. The phosphorylation of FAK Y397 is an important feature for the activation of the FAK kinase, which has previously been found correlated to aggressiveness in ovarian carcinoma and other carcinoma (33). FAK promotes invasion, cell adhesion and matrix adhesion cross talk, as well as matrix adhesion independent cell growth and a protection from anoikis (34). FAK Y397 activation promotes anti apoptotic effects and stimulates cell proliferation through the Ras-Erk MAPK pathway. Although the phosphorylation of FAK Y397 may not reflect necessarily the FAK protein activity, the present observation therefore is in marked contrast with what is observed in carcinoma cells, and point out a possible distinct activation pattern and role of FAK in sarcomas, as compared to carcinomas (33). The biological significance of the alteration of FAK phosphorylation profile will need to be further investigated.

In conclusion, we identified specific protein expression profiles in LMS as compared to normal smooth muscle, and reported the presence of an autocrine loop of Tyro3 and Gas6 in a subset of this disease. Tyro3/Gas6 co expression is associated with Akt phosphorylation in tumor samples and cell lines, and may contribute to the loss of FAK Y397 phosphorylation, which was found to be one of the hallmarks of LMS tumor samples in this series. The Tyro3 family receptors may represent an interesting target for tyrosine kinase inhibitors in a subset of leiomyosarcomas.

**Fig.1: Loss of FAK Y397 phosphorylation in LMS tumors vs normal smooth muscle**

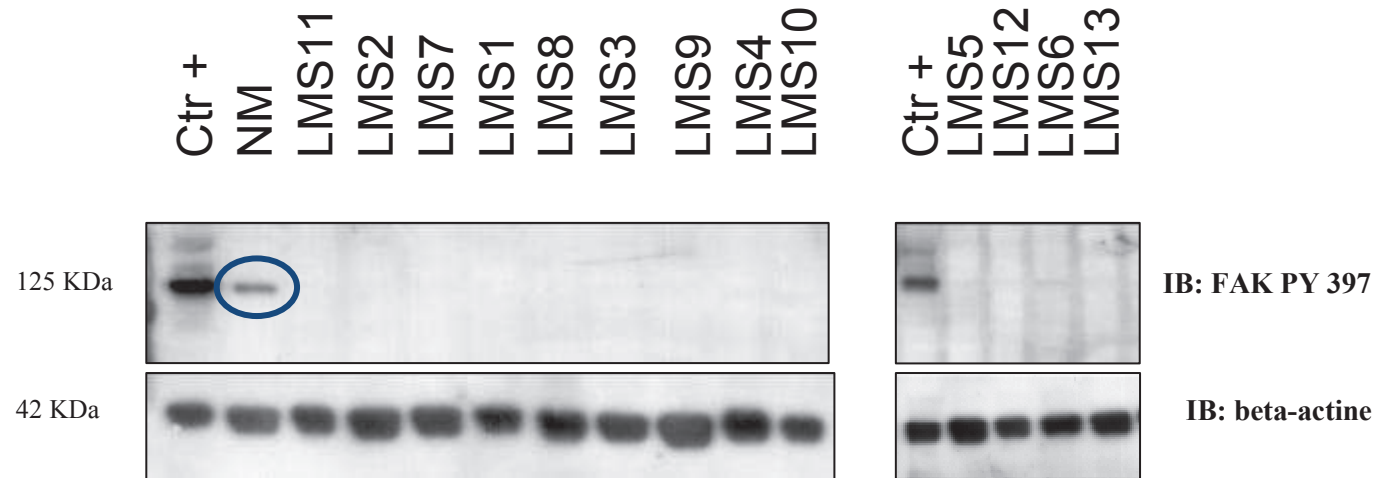
**Fig. 1A**

Kinex Assay



**Fig. 1B**

Western blot



**Fig. 1C: Overexpression of Tyro3, PKC theta and MSH2 in LMS samples vs normal smooth muscle**

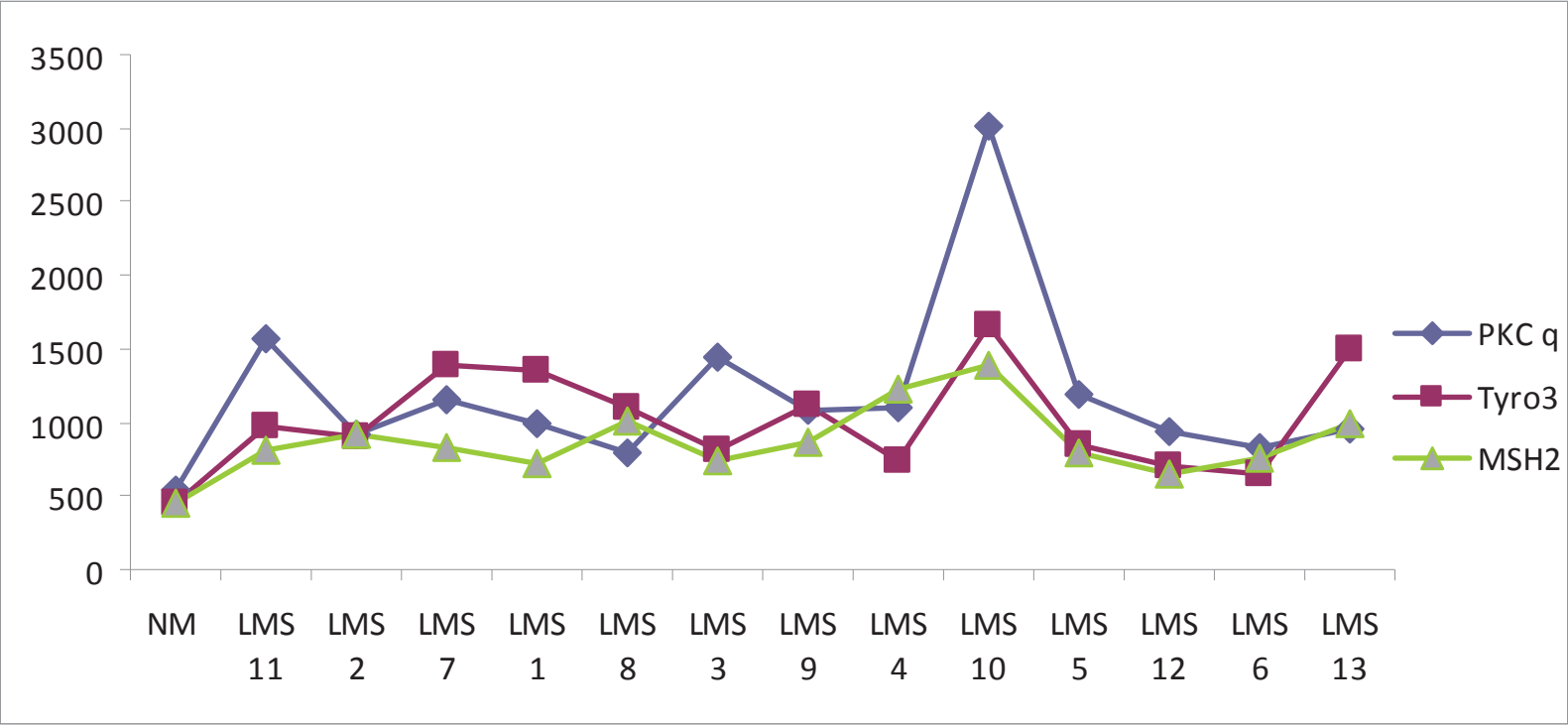


Fig.2: Two subgroups of LMS distinguished by the expression of 4 proteins

Fig. 2A

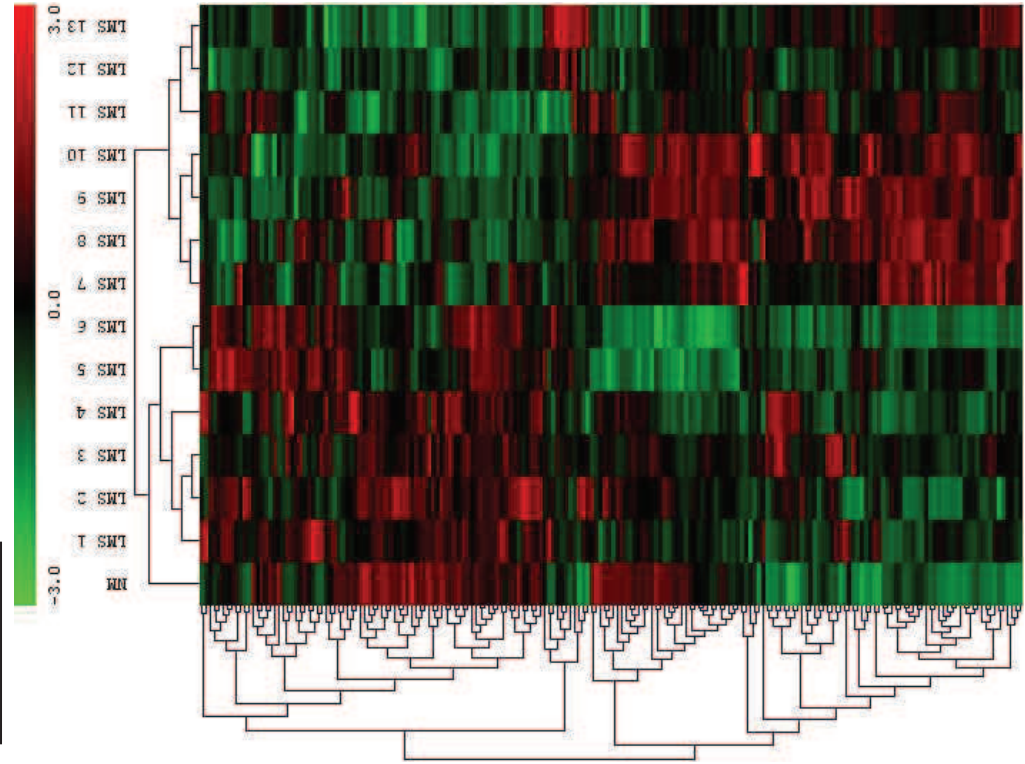
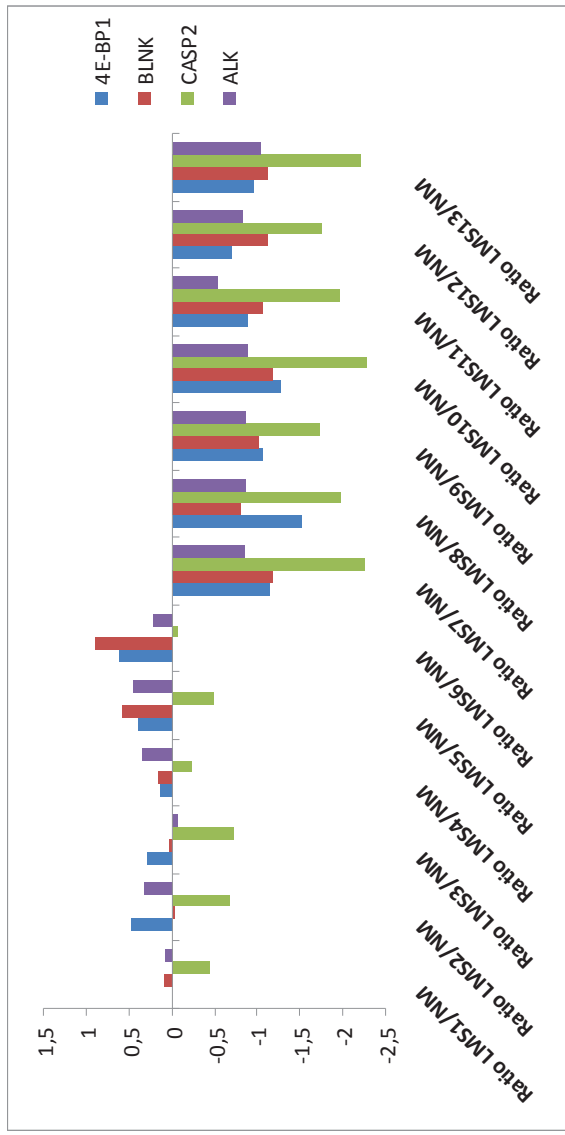
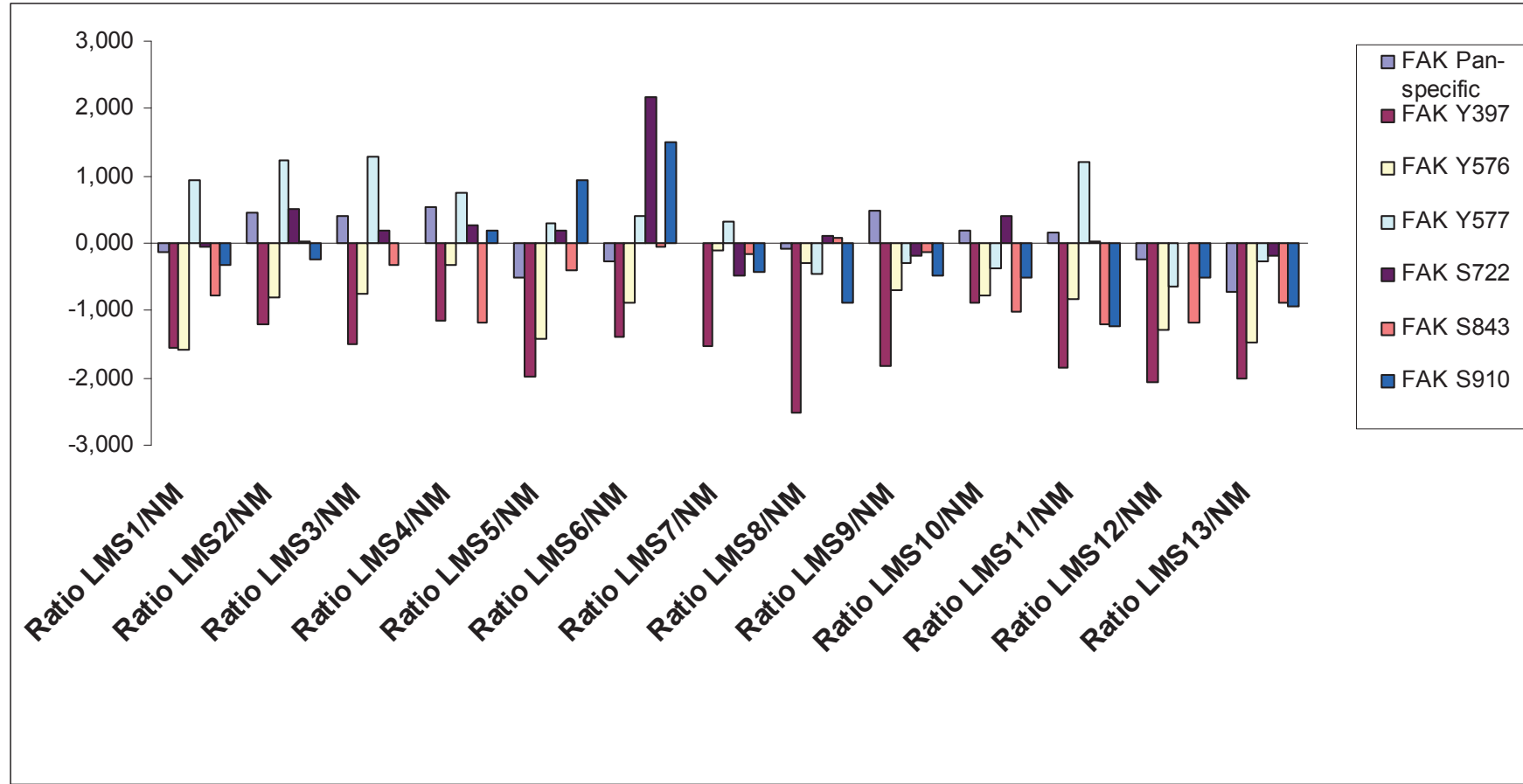


Fig. 2B

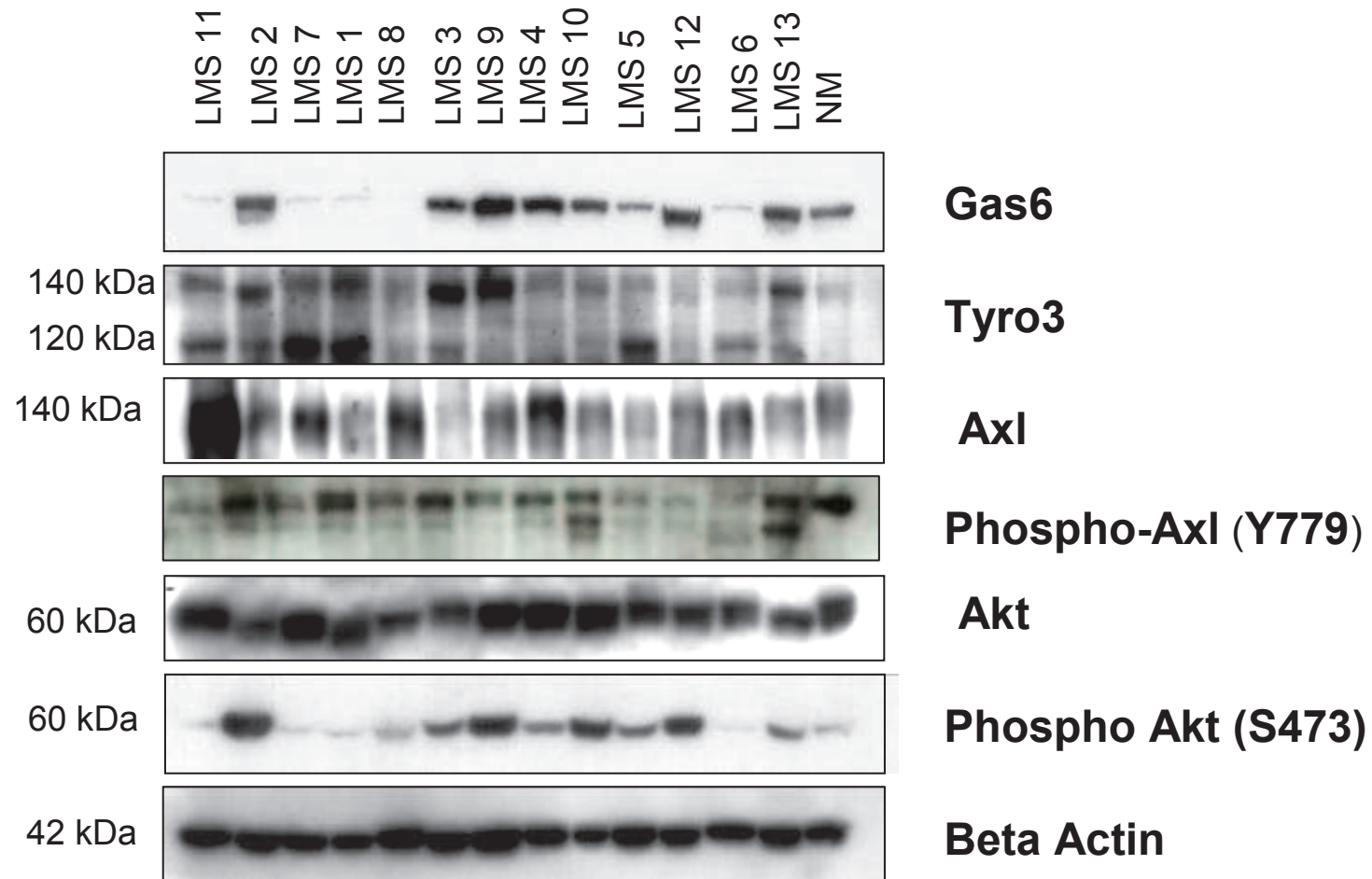


**Fig. 2C: Pattern of FAK phosphorylation in the 2 groups of leiomyosarcomas**

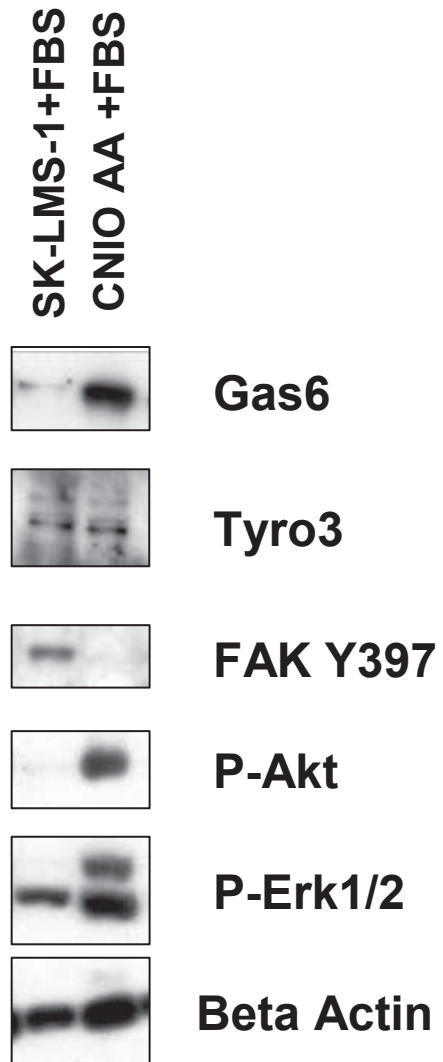




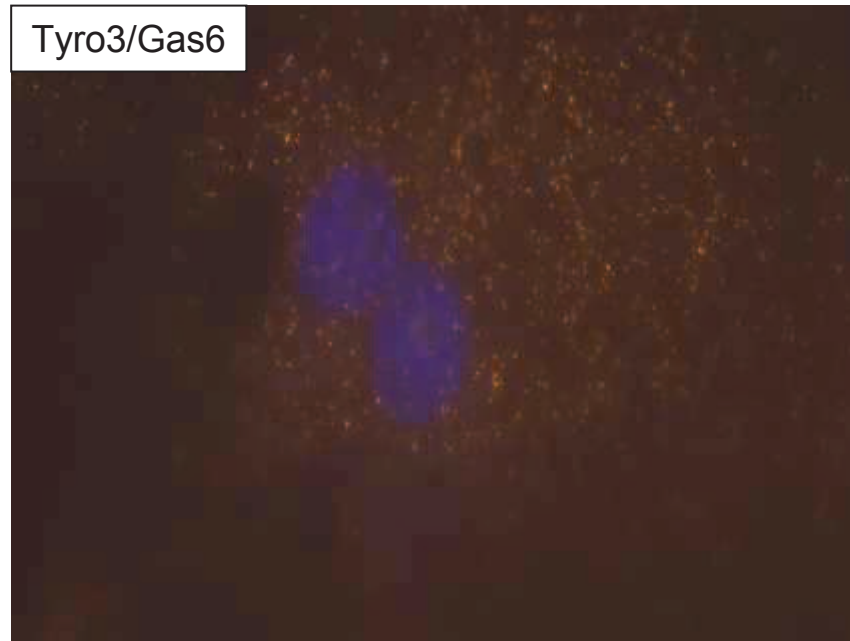
**Fig. 3A: Expression of Tyro3, Gas 6 and phospho Akt in LMS tumors and cell lines**



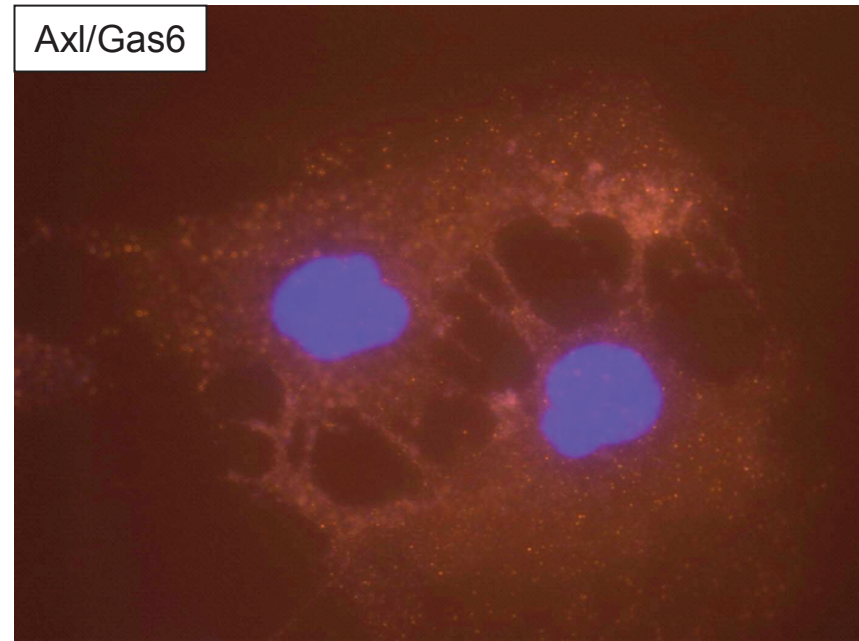
**Fig. 3B: Tyro3, Gas 6 and Akt, Erk1/2 expression in LMS cell lines**



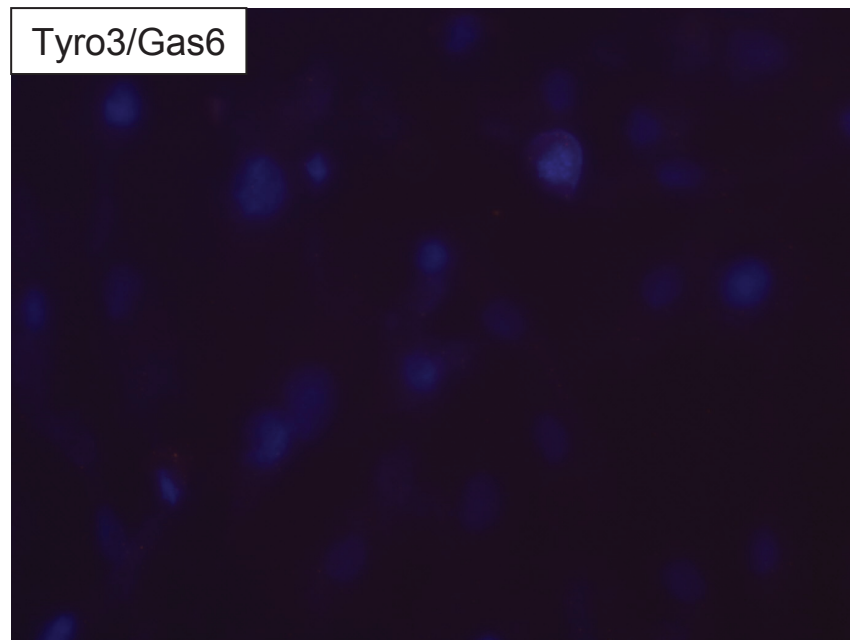
**Fig.4A**



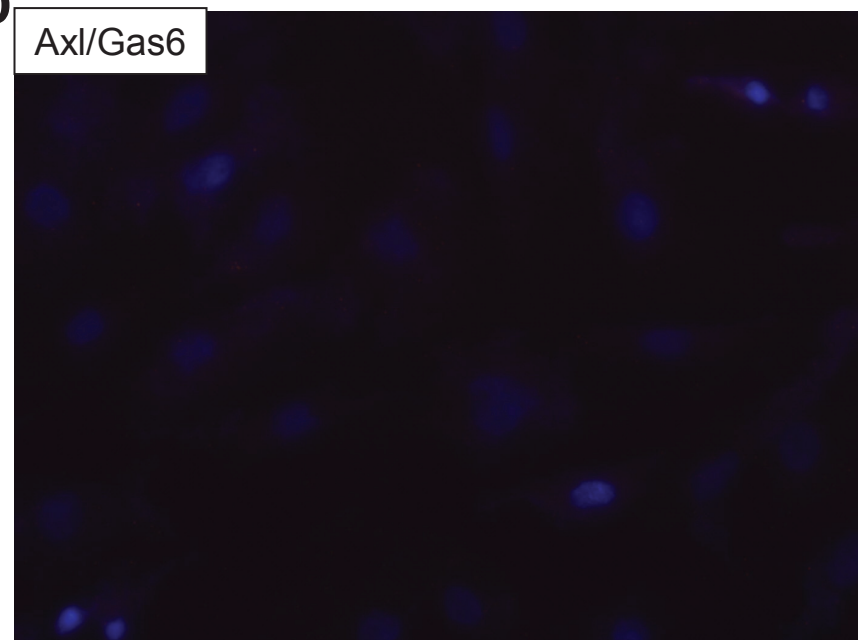
**B**



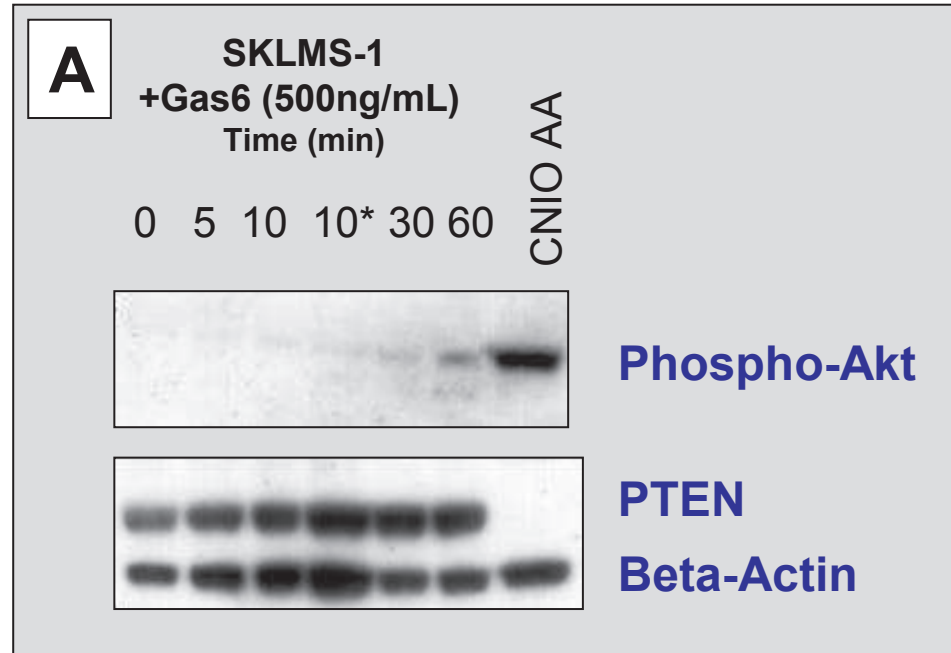
**C**



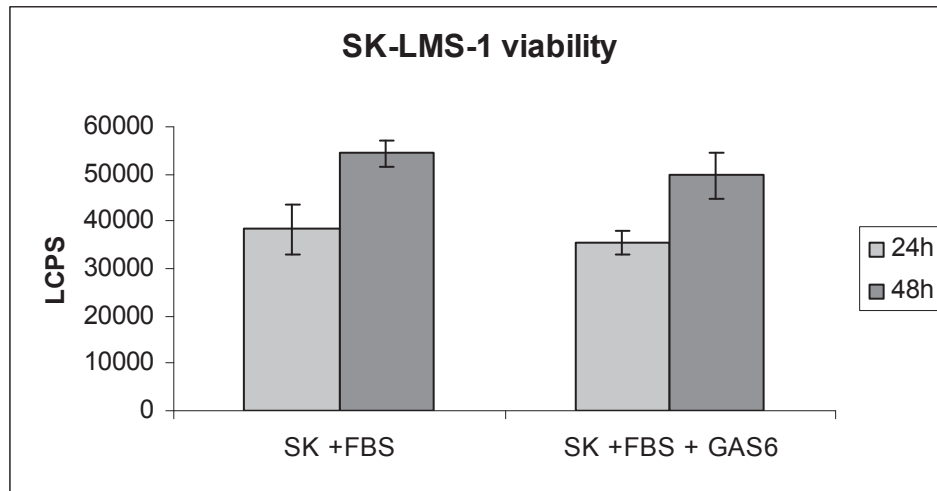
**D**



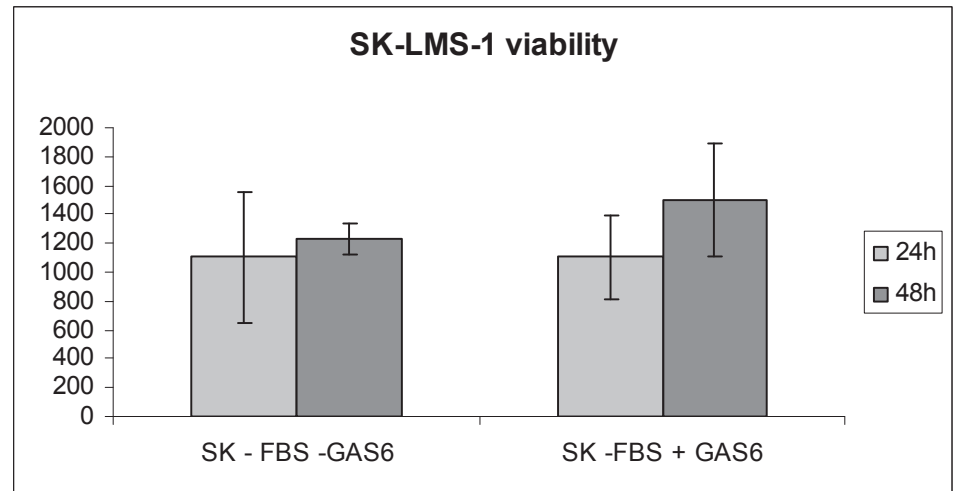
**Fig. 5: Modulation of P-Akt and cell viability by exogenous Gas6 in SK-LMS-1**



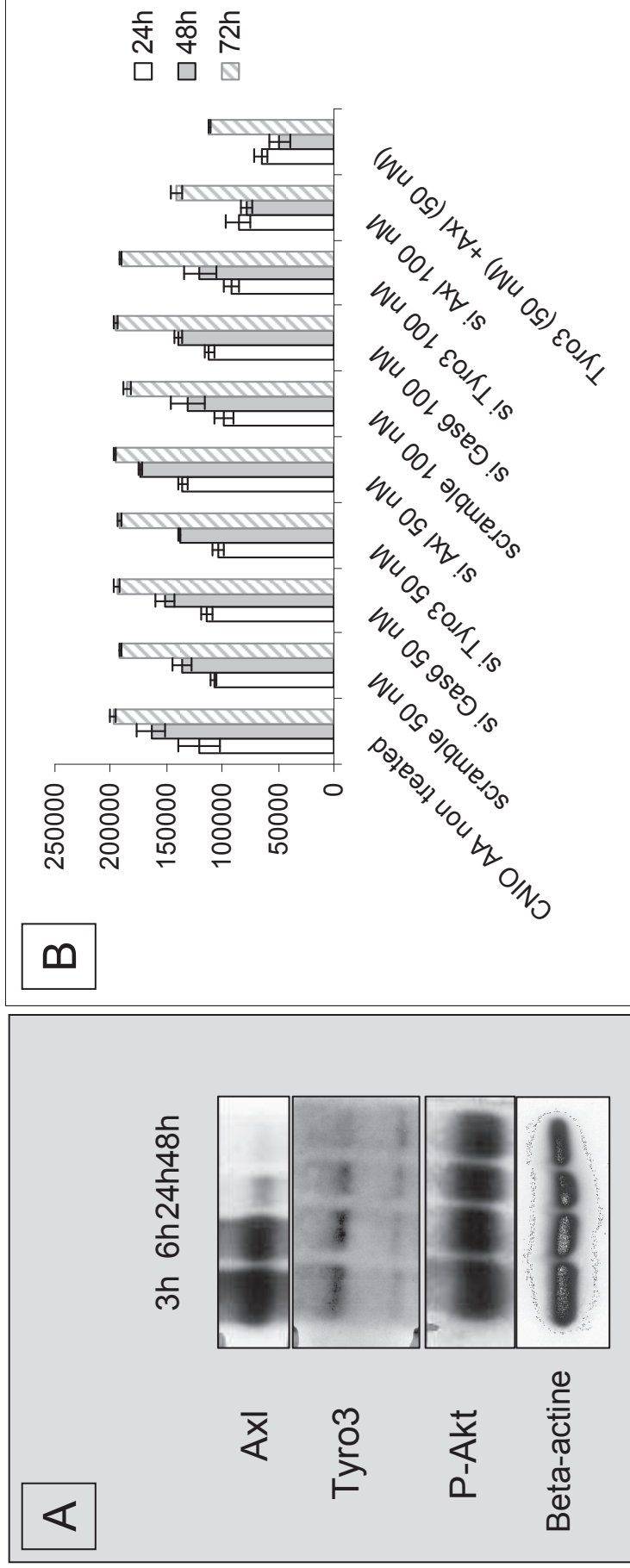
**B**



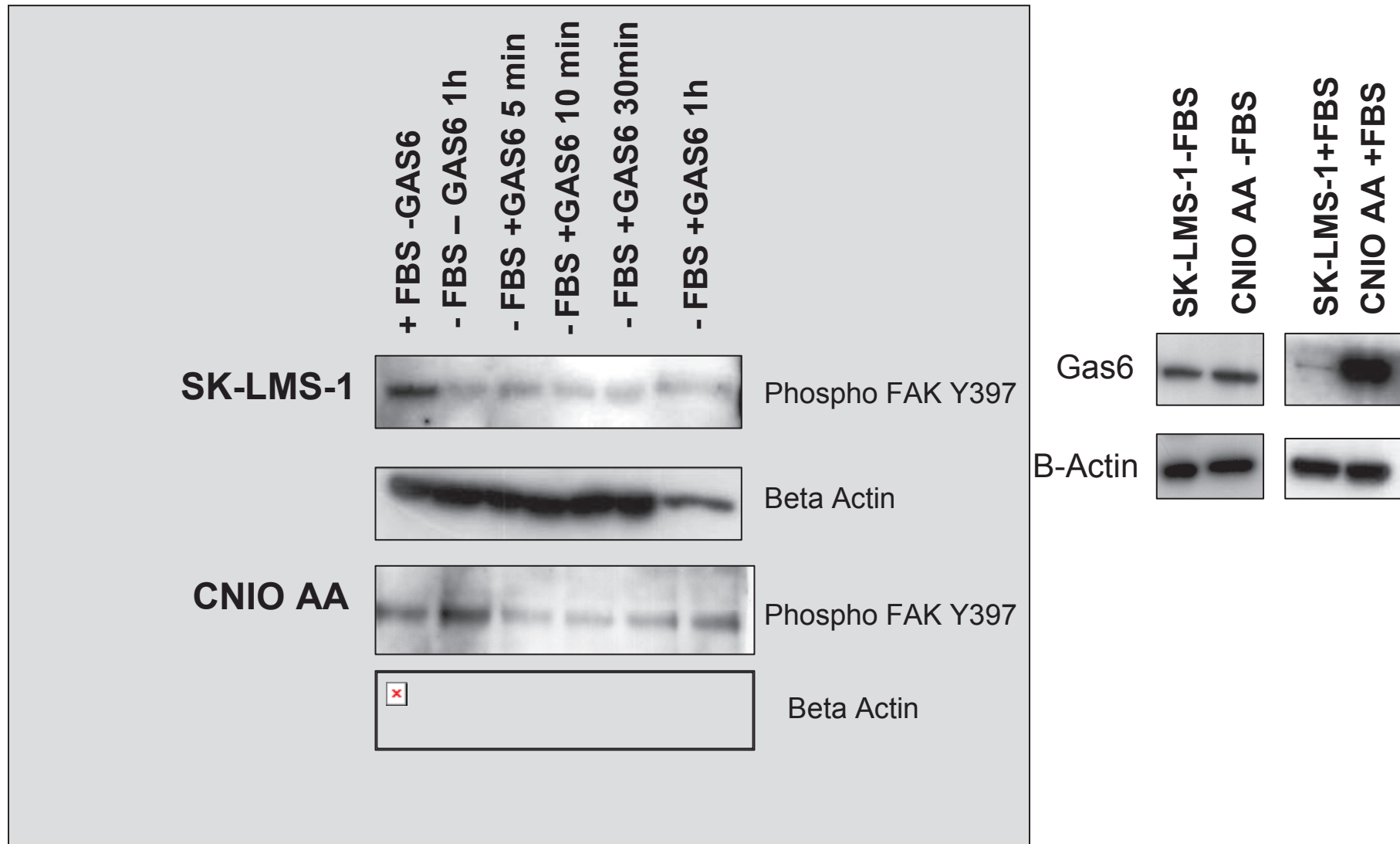
**C**



**Fig. 6: Combination of Tyro3 and Axl siRNA reduce CNIO AA cell viability**



**Fig. 7: Modulation of FAK Y397 phosphorylation by exogenous Gas6 in SK-LMS-1**



## **Legends to the figures:**

### **Figure 1: Differential expression of 4 proteins in leiomyosarcoma vs. normal smooth muscle**

A: Loss of FAK Y397 phosphorylation in leiomyosarcomas tumors vs normal smooth muscle using the Kinex assay; B: Western blot experiment showing the loss of FAK Y397; C: Over expression of Tyro3, PKC theta, and MSH2 in LMS samples as compared to normal uterine muscle using the Kinex assay

### **Figure 2: Two subgroups of leiomyosarcomas according to protein expression profile**

A: Non supervised clustering distinguishes 2 subgroups of leiomyosarcomas.

B: The two subgroups of LMS distinguished by the expression of 4 proteins: 4EBP1, BLNK, CASP2, ALK

C: Pattern of FAK phosphorylation in the 2 groups of leiomyosarcomas

### **Figure 3: Expression of Tyro3, Axl, Gas6, and Akt in leiomyosarcomas**

A: Expression of Tyro-3, Gas 6, Axl and Akt in LMS tumors

B: Expression of Tyro-3, Gas 6 and Axl, Erk and Akt in LMS cell lines

### **Figure 4: Co-localisation of Tyro3 and Gas6**

Colocalisation of Tyro3 & Gas 6 (A, C) and Axl & Gas6 (B,D) in CNIO AA (A,B) but not in SK-LMS-1 (C,D)

**Figure 5:** Modulation of Akt phosphorylation (A) and cell viability by exogenous Gas6 in SK-LMS-1, in the presence (B) or absence of serum (C).

### **Figure 6: Combination of Tyro3 and Axl siRNA reduce CNIO AA cell viability**

### **Figure 7: Modulation of FAK Y397 phosphorylation by exogenous Gas6 in SK-LMS-1**

## References

1. The histology of tumors of the soft tissues. WHO Classification 2002
2. Clark MA, Fisher C, Judson I, Thomas JM. Soft-tissue sarcomas in adults. *N Engl J Med.* 2005;353:701-11.
3. JR. Toro, LB. Travis, HJ Wu, K Zhu, CDM. Fletcher, SS. Devesa. Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the Surveillance, Epidemiology and End Results program, 1978–2001: an analysis of 26,758 cases *Int. J. Cancer:* 119, 2922–2930 (2006)
4. F. Ducimetière, A.Lurkin, D.Ranchère-Vince, AV Decouvelaere, M Péoch, L Istier, P.Chalabreysse, C.Muller, L. Alberti, PP Bringuier, J-Y Scoazec, A-M Schott, C.Bergeron D.Cellier, J-Y Blay, Isabelle Ray-Coquard. ospective incidence of sarcoma after systematic review of pathological diagnosis: New findings. (submitted for publication)
5. Casali PG, Jost L, Sleijfer S, Verweij J, Blay JY; ESMO Guidelines Working Group. Soft tissue sarcomas: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2009 May;20 Suppl 4:132-6.
6. Van Glabekke M, van Oosterom AT, Oosterhuis JW, Mouridsen H, Crowther D, Somers R et al. Prognostic factors for the outcome of chemotherapy in advanced soft tissue sarcoma: an analysis of 2,185 patients treated with anthracycline-containing first-line regimens--a European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Study. *J Clin Oncol.* 1999;17:150-7.
7. Blay JY, van Glabbeke M, Verweij J, van Oosterom AT, Le Cesne A, Oosterhuis. JW, Judson I, Nielsen OS. Advanced soft-tissue sarcoma: a disease that is potentially curable for a subset of patients treated with chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2003 Jan;39(1):64-9.
8. Le Cesne A, Blay JY, Judson I, Van Oosterom A, Verweij J, Radford J, Lorigan P, Rodenhuis S, Ray-Coquard I, Bonvalot S, Collin F, Jimeno J, Di Paola E, Van Glabbeke M,



Nielsen OS. Phase II Study of ET-743 in Advanced Soft Tissue Sarcomas: A European Organisation for the Research and Treatment of Cancer (EORTC) Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Trial. *J Clin Oncol*. 2005 Jan 20;23(3):576-584.

9. Bay JO, Ray-Coquard I, Fayette J, Leyvraz S, Cherix S, Piperno-Neumann S, Chevreau C, Isambert N, Brain E, Emile G, Le Cesne A, Cioffi A, Kwiatkowski F, Coindre JM, Bui NB, Peyrade F, Blay JY. Docetaxel and gemcitabine combination in 133 advanced soft-tissue sarcomas: A retrospective analysis. *Int J Cancer*. 2006 Feb 22; [Epub ahead of print]

10. Maki RG, Wathen JK, Patel SR, Priebat DA, Okuno SH, Samuels B, Fanucchi M, Harmon DC, Schuetze SM, Reinke D, Thall PF, Benjamin RS, Baker LH, Hensley ML. Randomized phase II study of gemcitabine and docetaxel compared with gemcitabine alone in patients with metastatic soft tissue sarcomas: results of sarcoma alliance for research through collaboration study 002. *J Clin Oncol*. 2007 Jul 1;25(19):2755-63.

11. Sleijfer S, Ray-Coquard I, Papai Z, Le Cesne A, Scurr M, Schöffski P, Collin F, Pandite L, Marreaud S, De Brauwier A, van Glabbeke M, Verweij J, Blay JY. Pazopanib, a Multikinase Angiogenesis Inhibitor, in Patients With Relapsed or Refractory Advanced Soft Tissue Sarcoma: A Phase II Study From the European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (EORTC Study 62043). *J Clin Oncol*. 2009 May 18

12. Blay JY, Le Cesne A, Alberti L, Ray-Coquard I. Targeted cancer therapies. *Bull Cancer*. 2005 Feb;92(2):E13-8.),

13. Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. *Nat.Rev.Cancer*. 2003;3:685-94.

14. Carneiro A, Francis P, Bendahl PO, Fernebro J, Akerman M, Fletcher C, Rydholm A, Borg A, Nilbert M. Indistinguishable genomic profiles and shared prognostic markers in undifferentiated pleomorphic sarcoma and leiomyosarcoma: different sides of a single coin? *Lab Invest*. 2009 Jun;89(6):668-75.

15. Pérot G, Derré J, Coindre JM, Tirode F, Lucchesi C, Mariani O, Gibault L,

Guillou L, Terrier P, Aurias A. Strong smooth muscle differentiation is dependent on myocardin gene amplification in most human retroperitoneal leiomyosarcomas. *Cancer Res.* 2009 Mar 15;69(6):2269-78. Epub 2009 Mar 10.

16. Larramendy ML, Gentile M, Soloneski S, Knuutila S, Böhling T. Does comparative genomic hybridization reveal distinct differences in DNA copy number sequence patterns between leiomyosarcoma and malignant fibrous histiocytoma? *Cancer Genet Cytogenet.* 2008 Nov;187(1):1-11.

17. Larramendy ML, Kaur S, Svarvar C, Böhling T, Knuutila S. Gene copy number profiling of soft-tissue leiomyosarcomas by array-comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006 Sep;169(2):94-101.

18. Meza-Zepeda LA, Kresse SH, Barragan-Polania AH, Bjerkehagen B, Ohnstad HO, Namløs HM, Wang J, Kristiansen BE, Myklebost O. Array comparative genomic hybridization reveals distinct DNA copy number differences between gastro-intestinal stromal tumors and leiomyosarcomas. *Cancer Res.* 2006 Sep 15;66(18):8984-93.

19. Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK. TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res.* 2008; 100:35-83.

20. Ericson K, Engellau J, Persson A, Lindblom A, Domanski H, Akerman M, Nilbert M. Immunohistochemical Loss of the DNA Mismatch Repair Proteins MSH2 and MSH6 in Malignant Fibrous Histiocytomas. *Sarcoma.* 2004;8(4):123-7.

21. Nilbert M, Therkildsen C, Nissen A, Akerman M, Bernstein I. Sarcomas associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer: broad anatomical and morphological spectrum. *Fam Cancer.* 2009;8(3):209-13. Epub 2009 Jan 8.

22. Kratz CP, Holter S, Etzler J, Lauten M, Pollett A, Niemeyer CM, Gallinger S, Wimmer K. Rhabdomyosarcoma in patients with constitutional mismatch-repair-deficiency syndrome. *J Med Genet.* 2009 Jun;46(6):418-20. Epub 2009 Mar 16. PubMed PMID: 19293170.

23. Lynch HT, Deters CA, Hogg D, Lynch JF, Kinarsky Y, Gatalica Z. Familial sarcoma: challenging pedigrees. *Cancer*. 2003 Nov 1;98(9):1947-57.
24. Kang GH, Kim KM, Park CK, Kang DY. PKC-theta expression in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumour and malignant peripheral nerve sheath tumour. *Histopathology*. 2009 Sep;55(3):368-9. PubMed PMID: 19723158.
25. Blay P, Astudillo A, Buesa JM, Campo E, Abad M, García-García J, Miquel R, Marco V, Sierra M, Losa R, Lacave A, Braña A, Balbín M, Freije JM. Protein kinase C theta is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors but not in other mesenchymal neoplasias. *Clin Cancer Res*. 2004 Jun 15;10(12 Pt 1):4089-95.
26. Gustafsson A, Martuszevska D, Johansson M, Ekman C, Hafizi S, Ljungberg B, Dahlbäck B. Differential expression of Axl and Gas6 in renal cell carcinoma reflecting tumor advancement and survival. *Clin Cancer Res*. 2009 Jul 15;15(14):4742-9. Epub 2009 Jun 30.
27. Koorstra JB, Karikari CA, Feldmann G, Bisht S, Rojas PL, Offerhaus GJ, Alvarez H, Maitra A. The Axl receptor tyrosine kinase confers an adverse prognostic influence in pancreatic cancer and represents a new therapeutic target. *Cancer Biol Ther*. 2009 Apr;8(7):618-26. Epub 2009 Apr 22.
28. Hong CC, Lay JD, Huang JS, Cheng AL, Tang JL, Lin MT, Lai GM, Chuang SE. Receptor tyrosine kinase AXL is induced by chemotherapy drugs and overexpression of AXL confers drug resistance in acute myeloid leukemia. *Cancer Lett*. 2008 Sep 18;268(2):314-24. Epub 2008 May 27.
29. Zhang YX, Knyazev PG, Cheburkin YV, Sharma K, Knyazev YP, Orfi L, Szabadkai I, Daub H, Kéri G, Ullrich A. AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression. *Cancer Res*. 2008 Mar 15;68(6):1905-15. PubMed PMID: 18339872.
30. Hutterer M, Knyazev P, Abate A, Reschke M, Maier H, Stefanova N, Knyazeva T, Barbieri V, Reindl M, Muigg A, Kostron H, Stockhammer G, Ullrich A. Axl and growth

arrest-specific gene 6 are frequently overexpressed in human gliomas and predict poor prognosis in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res.* 2008 Jan 1;14(1):130-8.

31. Fernebro J, Francis P, Edén P, Borg A, Panagopoulos I, Mertens F, Vallon-Christersson J, Akerman M, Rydholm A, Bauer HC, Mandahl N, Nilbert M. Gene expression profiles relate to SS18/SSX fusion type in synovial sarcoma. *Int J Cancer.* 2006 Mar 1;118(5):1165-72.

32. Lan Z, Wu H, Li W, Wu S, Lu L, Xu M, Dai W. Transforming activity of receptor tyrosine kinase tyro3 is mediated, at least in part, by the PI3 kinase-signaling pathway. *Blood.* 2000 Jan 15;95(2):633-8.

33. McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer.* 2005 Jul;5(7):505-15.

34. 1: Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, Chan-Hui PY. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol.* 1996 Aug;134(3):793-9

35. Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol.* 2000 May;2(5):249-56.

36. Brunton VG, Avizienyte E, Fincham VJ, Serrels B, Metcalf CA 3rd, Sawyer TK, Frame MC. Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior. *Cancer Res.* 2005 Feb 15;65(4):1335-42.

**Article 2 publié :**  
**Kit mutations induce intracellular retention and activation of an immature form of the KIT protein in Gastro-Intestinal Stromal Tumors (GISTs)**

Clinical Cancer Research 2008 Apr 15;14(8):2285-94.

Tabone-Eglinger S, Subra F, El Sayadi H, Alberti L, Tabone E, Michot JP, Théou-Anton N, Lemoine A, Blay JY, Emile JF

Equipe Cytokines et Cancers, INSERM U590, Lyon, France.

Contexte de l'étude :

Depuis la découverte en 1998, du rôle des mutations activatrices de KIT dans la genèse des GISTs (Hirota et al., 1998), et l'efficacité de l'inhibition de son activité tyrosine kinase par l'imatinib (Glivec®) (Joensuu et al., 2001), plusieurs études ont analysé en détail le rôle de KIT dans le diagnostic, le pronostic et biologique de la tumeur.

Parmi les mutations activatrices de *KIT* les plus fréquentes dans les GISTs, se trouvent les délétions et mutations ponctuelles dans l'exon 11 (domaine juxtamembranaire) (Hirota et al., 1998). D'autres types de mutations de *KIT* ont été aussi identifiés, touchant les exons 9 et 13 (Lux et al., 2000), et l'exon 17 (Rubin et al., 2001). La réponse au traitement par l'imatinib dépend largement du génotype de la tumeur. Les patients atteints de GIST avec mutations de l'exon 11 ont un taux de réponse, une survie sans progression de la tumeur, et une survie globale supérieure à celle des patients avec mutations situées dans l'exon 9 ou dans d'autres parties du gène. D'autre part, malgré l'efficacité de cet inhibiteur dans l'amélioration du pronostic des patients, certaines tumeurs sont insensibles au traitement, tandis que d'autres développent une résistance secondaire liée à l'émergence de sous clones équipés de mutations codant pour des protéines résistantes à l'imatinib. La relation entre l'expression du récepteur, le type de mutation et la réponse à l'imatinib reste ainsi encore imparfaitement comprise. L'objectif de cette étude était de comprendre le rôle de deux types de mutations dans l'exon 11 de *KIT* dans la biologie des GISTs, et d'analyser les propriétés biologiques différentielles de ces deux types de mutations, une correspondant à la délétion des codons 557 et 558 (D6), une comportant une délétion plus large, de 18 codons (D54) en aval de la première.

## Résumé de l'étude :

Nous avons utilisé des cellules NIH3T3 infectées par des vecteurs oncoviraux contenant les séquences ADN de KIT humain WT, ou de KIT muté sur l'exon 11, comme modèle cellulaire *in vitro*. Nous avons étudié la localisation cellulaire, l'activation, et le trafic intracellulaire des formes matures et immatures de KIT au sein des échantillons de GISTs et des lignées cellulaires *in vitro*.

La localisation cellulaire de KIT est hétérogène dans les GISTs. Elle est membranaire, cytoplasmique, et/ou para nucléaire (aspect « Golgi-like »). Nous l'avons examinée en immunohistochimie, sur des échantillons de GISTs et sur les lignées cellulaires sans mutations, avec mutations homozygotes, ou mutations hétérozygotes de *KIT*. Nous observons que l'aspect « Golgi-like » du marquage KIT était plus fréquent parmi les GISTs avec mutations homozygotes que ceux porteuses de mutations hétérozygotes ( $p=0,01$ ) ou sans mutation ( $p < 0,01$ ). De plus, l'activation de la forme immature (125 kDa) de KIT était détectée dans la plupart des GISTs mutées sur KIT, mais dans aucun des GISTs sans mutation. Dans les cellules NIH3T3, la protéine KIT mutante a été retrouvée principalement dans le réticulum endoplasmique et le Golgi sous une forme immature et constitutivement phosphorylée, alors que la protéine KIT normale était exprimée à la membrane cytoplasmique sous une forme mature non phosphorylée. Ceci suggère un rôle oncogénique potentiel de cette forme immature phosphorylée intracellulaire de KIT, contournant le trafic et la maturation post-translacionnelle normaux de la protéine.

L'inhibition par l'imatinib de la phosphorylation des formes immatures et matures de KIT mutant conduit à la restauration de l'expression de KIT à la surface cellulaire, démontrant que l'altération de la maturation et du trafic intracellulaire de KIT résulte de son état d'activation constitutif (lié à la mutation).

## Conclusion

L'ensemble de ces résultats suggère que les mutations activatrices de *KIT* les plus fréquemment retrouvées dans les GISTs, induisent une altération de la maturation normale et du trafic cellulaire à l'origine de la rétention intracellulaire de la protéine KIT mutante. Ces observations pourraient expliquer l'absence de corrélation entre la réponse à l'imatinib et

l'expression de KIT en immunohistochimie et pourraient également impliquer d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase dans d'autres modèles de tumeurs.

**Article 3 publié:**  
**Complete response to imatinib in relapsing pigmented villonodular synovitis/tenosynovial giant cell tumor (PVNS/TGCT).**

Ann Oncol. 2008 Apr;19(4):821-2. Epub 2008 Feb 21.

Blay JY, El Sayadi H, Thiesse P, Garret J, Ray-Coquard I

Contexte de l'étude :

La synovite villonodulaire pigmentée (PVNS), appelée aussi TGCT pour « tenosynovial giant cell tumor », est une hyperplasie villositaire ou nodulaire de la synoviale chez les jeunes adultes. C'est une tumeur bénigne localement agressive, présentant une translocation spécifique t(1 ; 2), impliquant le gène du collagène 6A3 (sur 2q35) et le gène M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) (sur 1p13) sur une partie des cellules tumorales (Cupp et al., 2007; West et al., 2006). Le gène de fusion résultant de la translocation, conduit à la surexpression de la protéine CSF1 causée par une forte activité du promoteur COL6A3. Il est suggéré que cette protéine de fusion attire par un effet paracrine, les cellules non néoplasmiques adjacentes exprimant le récepteur au M-CSF (M-SCFR) (Cupp et al., 2007; West et al., 2006). La chirurgie, lorsqu'elle est possible, constitue le traitement premier de cette pathologie.

Résumé de l'étude :

En plus de son activité inhibitrice de BCR-ABL, KIT et PDGFRA, il a récemment été montré que l'imatinib utilisé à doses thérapeutiques, permettait de bloquer l'activation du récepteur au M-CSF (Dewar et al., 2005). L'imatinib a donc été testé dans cette étude, en traitement de seconde ligne chez un patient porteur de SVNP/TTCG en rechute après chirurgie. Le patient a présenté une rémission complète, mais des études plus approfondies seront nécessaires pour confirmer l'activité de l'imatinib dans cette indication. En effet, l'équipe de Moller E a analysé les transcrits chimères de six patients atteints de PVNS, et a reporté que la protéine de fusion résultante manquant la partie amino-terminale du CSF (non codée), ne pourrait interagir avec le récepteur au M-CSF (Moller et al., 2008). Le cas clinique présenté indique cependant l'implication d'une cible spécifique de l'imatinib, responsable de la croissance tumorale, le plus probablement.



## Conclusion et développements futurs

Cette étude illustre l'efficacité de la thérapie ciblée dans un modèle tumoral où l'altération moléculaire est l'évènement causal du processus néoplasique. Il nous encourage également à pousser nos recherches dans l'identification de molécules cibles dans les autres sous-types de sarcomes.

Un des projets de notre thèse était de pouvoir procéder au même type d'analyse que celles réalisées dans les léiomyosarcomes, utilisant une analyse du profil protéomique de ces tumeurs afin de détecter des voies d'activation mises en jeu dans ces tumeurs composites, qui associent un contingent de cellules tumorales et un contingent de cellules stromales non tumorales, mais qui contribuent à la croissance de la tumeur clinique, et des cellules tumorales. Malheureusement, l'étude clinique prospective destinée à collecter ces échantillons tumoraux pour procéder à ces analyses, avant et après traitement n'a pu être activée encore à ce jour, et sera réalisée avec le nilotinib.

Notons qu'une analyse rétrospective des cas de PVNS traités par l'imatinib dans plusieurs centres spécialisés est en cours : sur les neuf observations à ce jour disponibles, cinq patients ont présenté une réponse objective et quatre une maladie stabilisée. Ces résultats doivent être complétés par l'apport d'autres observations.

## Discussion

### **Les sarcomes: un ensemble de maladies hétérogènes dont les caractéristiques moléculaires guident le traitement**

Les sarcomes constituent un ensemble composite de tumeurs malignes rares. Leur classification histologique et moléculaire, et partant leur prise en charge, ont été en constante évolution. Si la chirurgie, le plus souvent associée à la radiothérapie, constitue la base thérapeutique des formes localisées, pour les formes métastatiques ou localement avancées, la chimiothérapie est le traitement de première intention, même si la chirurgie et la radiothérapie permettent parfois d'obtenir des remissions complètes prolongées même en situation avancée. Les taux de réponse aux agents cytotoxiques conventionnels sont médiocres, le plus souvent inférieurs à 25%, avec des durées de survie sans progression courtes, typiquement voisines de 4 à 6 mois. Cependant, les progrès les plus notables ont été accomplis dans le domaine de la caractérisation histologique et moléculaire de ces tumeurs. Ils ont permis de poser les paradigmes et les bases conceptuelles des traitements ciblés des tumeurs malignes, avec des implications portant au-delà des tumeurs conjonctives. Ainsi, les progrès réalisés dans les vingt dernières années dans la compréhension des mécanismes de tumorigenèse des sarcomes ont permis d'identifier de nouvelles entités nosologiques, distinguées par des anomalies moléculaires spécifiques, au sein de groupes histologiques jusqu'alors rassemblés sans distinction.

Alors que la classification de l'OMS 2002 dénombrait plus de 50 sous-types histologiques de sarcomes (Histological classification of sarcomas. WHO 2002), on distingue maintenant plus de 150 sous types moléculaires de sarcomes (Helman and Meltzer, 2003). Ils sont différenciés par leurs anomalies moléculaires « initiales ou causales », par exemple la topographie des mutations de *KIT* sur ses différents exons dans les GIST ou les points de jonction des gènes de fusion des différentes translocations dans le sarcome d'Ewing (Helman and Meltzer, 2003; Mitelman et al., 2007) ou par leurs altérations génétiques secondaires, comme les régions du génome amplifiées dans les liposarcomes différenciés (Mariani et al., 2007). On ne peut ainsi plus parler de liposarcome sans distinguer les liposarcomes bien différenciés caractérisés par un amplicon contenant les gènes *MDM2* et *CDK4* sur le bras court du chromosome 12, différenciés avec des amplicons additionnels sur les chromosomes 1 ou 6 notamment (Mariani et al., 2007), myxoïdes avec différents sous types de translocations (Helman and

Meltzer, 2003; Mitelman et al., 2007) et pléomorphes caractérisés par des remaniements génomiques complexes, chacune de ces entités étant associée à des anomalies moléculaires spécifiques (Histological classification of sarcomas. WHO 2002).

En effet, cette cartographie moléculaire proposée depuis une vingtaine d'années dans les sarcomes n'a pas seulement permis une nouvelle classification nosologique mais surtout l'identification de cibles thérapeutiques potentielles, comme des protéines de fusion oncogéniques, des récepteurs tyrosine kinase mutés activés, l'amplification ou la translocation de gènes de cytokines, qui jouent vraisemblablement le rôle d'évènement oncogénique initial dans certaines de ces tumeurs (Helman and Meltzer, 2003). De nombreuses molécules, ciblant différentes voies de signalisation, sont actuellement testées en clinique.

On distingue ainsi six sous-types de sarcomes bien différenciés présentant des anomalies moléculaires spécifiques.

1) Les sarcomes avec translocations spécifiques ont été les premiers caractérisés. Les translocations aboutissent à la constitution de gènes de fusion codant des protéines qui agissent comme des facteurs de croissance (EWS/Flil dans le sarcome d'Ewing, PDGF-COL1A1 dans le DFSP) (Tableau 2). Ces protéines exercent des activités biologiques variées mais sont fréquemment des facteurs de transcription (par exemple la protéine de fusion EWS Flil), plus rarement des facteurs de croissance hybrides. L'incidence individuelle des sarcomes à translocation est inférieure à 5 cas par million d'habitants par an, au vu des données de l'étude d'épidémiologie moléculaire EMS (Ducimetière F, Lurkin A, Ranchere D et al. Prospective incidence of sarcoma after systematic review of pathological diagnosis: new findings. Proceeding of the CTOS 14th meeting, 2008 (abstract).

2) Les sarcomes porteurs de mutations touchant les récepteurs tyrosine kinases (KIT dans les GIST). Ces derniers font l'objet d'un chapitre spécifique.

3) Les sarcomes porteurs de délétion de gènes suppresseurs de tumeurs : on classe dans cette catégorie les sarcomes survenant dans un contexte de maladie de Recklinghausen et caractérisés par une délétion du gène NF-1 ; on peut citer également les tumeurs rhabdoïdes associées à une délétion ou une perte d'expression du gène INI1. Leur incidence est inférieure à 3 cas par million d'habitants par an, au vu des données de l'étude EMS (Ducimetière F, Lurkin A, Ranchere D et al. Prospective incidence of sarcoma after systematic review of pathological diagnosis: new findings. Proceeding of the CTOS 14th meeting, 2008 (abstract).

4) Les sarcomes porteurs d'altérations génétiques simples. Les liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés porteurs d'une amplification de mdm2/cdk4 constituent le principal type moléculaire de cette classe, avec une incidence voisine de 10 à 12 nouveaux cas par million

d'habitants par an dans l'étude EMS (Ducimetière F, Lurkin A, Ranchere D et al. Prospective incidence of sarcoma after systematic review of pathological diagnosis: new findings. Proceeding of the CTOS 14th meeting, 2008 (abstract).

5) Les sarcomes à génétique complexe, porteurs d'altérations génomiques nombreuses et hétérogènes avec de multiples gains et pertes de différents segments chromosomiques. Les léiomyosarcomes, les fibrohistiocytes malins, les liposarcomes ou rhabdomyosarcomes pléomorphes sont les principaux dans cette catégorie. Ces sous types représentent 50% de l'ensemble des sarcomes des tissus mous Ducimetière F, Lurkin A, Ranchere D et al. Prospective incidence of sarcoma after systematic review of pathological diagnosis: new findings. Proceeding of the CTOS 14th meeting, 2008 (abstract).

6) Enfin on peut également distinguer les fibromatoses agressives- ou tumeurs desmoïdes- tumeurs conjonctives à malignité locale, porteuses de mutations des protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire via les molécules d'adhésion (délétion du gène APC ou mutation de la  $\beta$ -caténine dans les fibromatoses agressives).

Avec la généralisation des techniques de biologie moléculaire, cette classification est actuellement en pleine évolution. L'identification de mutations constitutionnelles spécifiques a permis le développement d'agents thérapeutiques ciblés efficaces contre certains sous-types histologiques de sarcomes. Le premier exemple a été l'identification de mutations activatrices de KIT et de PDGFRA, responsables de la transformation tumorale dans les tumeurs stromales gastro-intestinales, qui a amené le développement de plusieurs molécules ciblées comme l'imatinib, le sunitinib, le nilotinib ou encore le sorafenib. L'imatinib est également utilisé dans le traitement des DFSP, caractérisés par une translocation du gène du *PDGFA* avec le gène du *collagène 1A1*, aboutissant à la constitution d'une boucle autocrine avec un facteur de croissance muté, boucle qui peut être inhibée par l'imatinib. Plusieurs essais cliniques de phase I et II ont mis en évidence des réponses à l'anticorps anti-IGF1R dans les tumeurs du premier sous-type, les sarcomes d'Ewing, dans lesquelles le produit du gène de fusion régule la protéine IGF1R. Des inhibiteurs de CDK4 et MDM2 sont en cours d'évaluation clinique dans le quatrième sous-groupe.

Ces expériences ont inspiré la première partie de notre travail.

***Notre premier objectif de thèse était de proposer une analyse de ces entités complexes, probablement hétérogènes que sont les léiomyosarcomes.*** En l'absence d'anomalies récurrentes connues telles que des translocations, des mutations activatrices de RTK ou des pertes ou amplifications de chromosomes, nous nous sommes tournés vers l'analyse

protéomique afin d'identifier des voies d'activations spécifiques, dans ce sous-groupe nosologique et surtout de pouvoir tester des inhibiteurs des voies activées sur des lignées cellulaires. Le but final est de proposer de nouvelles thérapeutiques.

## **Premier aspect de notre travail : la recherche de cibles thérapeutiques dans les léiomyosarcomes**

Les léiomyosarcomes (LMS) sont composés de cellules à différenciation musculaire lisse et représentent 15 % des sarcomes de l'adulte (Ducimetière et al 2008). Ces tumeurs ont une large variété de présentations cliniques, pouvant toucher les tissus mous comme les viscères, mais aussi la peau, avec également des formes souvent agressives dans les localisations osseuses, des tissus mous et viscérales, mais parfois au contraire relativement indolentes dans des localisations cutanées. Les léiomyosarcomes présentent des altérations génétiques complexes avec pertes et gains de chromosomes, variables selon les tumeurs. Les études cytogénétiques se rapportant aux léiomyosarcomes sont nombreuses ; cependant elles n'ont pas permis, à ce jour, de mettre en évidence la présence d'anomalies moléculaires récurrentes, ni même de sous-groupes nosologiques clairs, empêchant ainsi la compréhension de la pathogenèse des LMS et l'identification des cibles thérapeutiques potentielles.

Dans ce contexte, notre objectif était d'identifier des protéines fonctionnelles par une approche de protéomique dans les léiomyosarcomes de toute topographie, afin d'établir un profil d'expression protéique susceptible d'être une signature moléculaire de ces tumeurs. Nous avons ainsi identifié une voie de signalisation activée dans les léiomyosarcomes : la voie Gas6/Tyro-3/Axl. Notre étude constitue la première observation de l'implication de cette voie dans la biologie des léiomyosarcomes, et des sarcomes en général, et même une des premières observations mettant en évidence un rôle d'une boucle d'activation autocrine Gas6/Tyro3 dans la biologie de tumeurs humaines.

Notre discussion portera tout d'abord sur les avantages et les inconvénients de l'approche protéomique utilisée et le rôle fonctionnel des protéines identifiées à l'issue de cette analyse, notamment Tyro-3 et FAK.

## **Un profil d'expression différentiel de kinases dans les léiomyosarcomes**

Au cours de ce travail, nous avons identifié des protéines kinases exprimées de manière différentielle entre les tumeurs de léiomyosarcomes et le tissu musculaire lisse normal. Pour ce faire, nous avons procédé à un criblage de protéines de signalisation, majoritairement des

kinases, à l'aide des puces à anticorps (KAM 1.1) de la société Kinexus (Vancouver, Canada). Ces approches protéomiques à haut débit ont émergé récemment comme méthode d'identification de profils d'expression de protéines et de leurs modifications post-translacionnelles comme la phosphorylation (Pelech, 2004). Cette méthodologie est de plus en plus utilisée dans les études de recherche de signature moléculaire dans les tumeurs, grâce à leur meilleur reflet de la biologie de la tumeur que les études de profil d'expression classique. En effet, seules les protéines actives déterminent le phénotype cellulaire et leur identification devient primordiale dans la recherche des cibles thérapeutiques, objectif essentiel de notre travail.

En outre, les études portant sur les profils d'expression de l'ARNm présentent des limitations techniques liées à la très grande sensibilité de la phase pré-analytique, notamment aux délais et aux techniques de conservation. Pour obtenir des résultats reproductibles dans les études de profil d'expression, il est nécessaire d'imposer une grande rigueur dans la congélation et la préparation des échantillons et dans l'analyse des données (Michiels et al., 2005).

Ces difficultés techniques et méthodologiques rendent compte en partie des discordances rapportées dans la littérature entre les profils d'expression de sarcomes de même histologie (Allander et al., 2002; Lee et al., 2003; Nagayama et al., 2002; Nielsen et al., 2002). Elles conduisent à considérer que l'analyse des profils d'expression de l'ARNm, n'est sans doute pas la technique optimale pour identifier de nouvelles cibles dans ces pathologies. Nous pouvons souligner à ce titre qu'une des rares études cliniques bâties sur la base d'une de ces analyses, et explorant un inhibiteur de tyrosine kinase de HER1 dans les synoviosarcomes a échoué, l'expression de l'ARNm de HER1 dans une des études (Nielsen et al., 2002) ayant conduit de manière erronée à identifier la protéine comme une cible pertinente potentielle (Ray-Coquard et al., 2008) contrairement aux autres études qui ne l'avaient pas trouvée discriminante.

Il est à noter que dans ces analyses de données issues des technologies d'hybridation sur puces, le nombre élevé d'échantillons permet d'obtenir des résultats plus solides et biologiquement significatifs. Notre série est clairement limitée par sa petite taille. Dans notre expérience, malgré le nombre restreint de tumeurs et de tissus sains (13 tumeurs de type leiomyosarcome) l'application de seuils statistiques stricts nous a permis d'obtenir une liste de protéines d'intérêt fiable, mais forcément réduite. En effet, nous avons éliminé les protéines qui ne sont pas exprimées différemment entre les tissus tumoraux et les tissus sains, mais aussi celles qui sont dans le bruit du fond ou très peu exprimées. Nous avons uniquement conservé celles qui étaient deux fois plus ou moins exprimées dans la tumeur ou dans le tissu

sain. Cette série doit cependant être confirmée par une série indépendante. Ce travail est en cours de réalisation sur une série de 30 tumeurs de la Conticabase (Pr. Jean-Michel COINDRE).

### **Quatre protéines différemment exprimées dans les LMS**

Nous avons identifié plusieurs protéines surexprimées dans les tumeurs par rapport au tissu sain et deux groupes distincts de tumeurs suite à une classification hiérarchique non supervisée. Parmi les 192 protéines sélectionnées lors de l'analyse des résultats de l'array Kinexus, nous avons déterminé les protéines les plus discriminantes entre les cellules tumorales fraîches de leiomyosarcome et le tissu musculaire lisse sain. Une surexpression de Tyro-3, PKC $\zeta$  et MSH2 et une perte de phosphorylation de FAK au résidu Y397 ont donc été identifiés comme paramètres discriminants des léiomyosarcomes par comparaison avec le muscle lisse normal.

La perte de la phosphorylation de FAK Y397 sera discutée dans un chapitre ultérieur et constitue un aspect très original de la biologie de ces tumeurs. La surexpression de MSH2 est inattendue : la perte constitutionnelle de MSH2 et MSH6 est associée dans la littérature à une augmentation modérée du risque de sarcome (Ericson et al., 2004). La surexpression de ces gènes n'a pas été rapportée dans ces tumeurs. Nous soulignons cependant que l'inhibition de MSH4 par siRNA, dans un criblage siRNA (22950 gènes, 3 siRNAs/gène, chaque siRNA testé en duplicat) bloque la prolifération de SK-LMS-1 ; MSH4 est l'un des 1375 gènes candidats identifiés dans ce criblage (résultats en cours, non présentés). A ce stade, nous pouvons conclure que cette observation mérite une confirmation sur une série indépendante, dans le travail en cours sur les 30 tumeurs supplémentaires.

La surexpression de PKC theta est également une des caractéristiques des LMS dans notre série. La surexpression de PKC theta a été rapportée dans les GIST, et moins constamment dans les PNET, mais pas dans les léiomyosarcomes (Blay et al., 2004; Kang et al., 2009).

### **Existe-t-il deux groupes protéomiques de léiomyosarcomes ?**

Nous avons tenté ensuite de regrouper les différents sous-types de léiomyosarcomes étudiés dans une analyse non supervisée. Deux groupes émergent, sur la base de l'expression :

1) de la forme phosphorylée sur S65 de 4E-BP1, une protéine en aval de la voie de signalisation de mTOR, présente dans le groupe 1 de manière identique au tissu musculaire sain, absente ou faible dans le groupe 2. Nous ne retrouvons cependant pas de corrélation

franche entre la présence de p-S65 4EBP1 et la présence de Gas6 ou de phospho Akt. Cette observation méritera une confirmation sur la série en cours d'analyse.

2) de la forme phosphorylée sur Y84 BLNK, une molécule exprimée uniquement dans les lymphocytes B, présente dans le groupe 1, absente ou faible dans le groupe 2. Cette observation reste inexpliquée et pourrait correspondre à un infiltrat inflammatoire dans le stroma. Ce point devra là encore être vérifié, sur la série en cours et, s'il est confirmé, confronté à une analyse immunohistochimique de l'infiltrat immunologique.

3) de la Caspase 2, une des enzymes impliquées dans l'apoptose, présente dans le groupe 1, absente ou faible dans le groupe 2.

4) de ALK (Anaplastic lymphoma kinase), présente dans le groupe 1, absente ou faible dans le groupe 2. Alk est amplifiée ou partenaire d'une translocation dans les tumeurs myofibroblastiques inflammatoires, mais n'a pas été décrite dans la littérature exprimée ou perdue dans les léiomyosarcomes.

Ces résultats démontrent l'existence d'une variabilité de voies de signalisation intracellulaires au sein de ces tumeurs, concordant avec les données de la littérature sur le plan génétique. Ils devront être validés dans la série prospective en cours d'analyse. Nous soulignons que l'inhibition de ces 4 protéines dans le criblage siRNA (22950 gènes, 3 siRNAs/gène, chaque siRNA testé en duplicat) mentionné précédemment ne bloque pas la prolifération de SK-LMS-1.

### **Présence d'une boucle d'activation autocrine Tyro-3/Gas6 dans les léiomyosarcomes**

La protéine Tyro-3 nous a particulièrement intéressés du fait de son rôle oncogénique récemment décrit. S'agissant d'un des 58 récepteurs tyrosine kinase du génome humain, elle représente donc une cible potentielle dans la perspective de développement de thérapeutiques ciblées. Sa surexpression conduit à la transformation des fibroblastes murins suite à l'activation de la voie PI3K/Akt (Taylor et al., 1995). Chez l'homme, l'expression de Tyro-3 a été rapportée dans les leucémies myéloïdes et le myélome multiple (Crosier et al., 1995; De Vos et al., 2001). De plus, une étude récente a montré l'implication de Tyro-3 dans la prolifération et la chimiorésistance des cellules de mélanome, faisant de cette protéine une cible thérapeutique intéressante dans cette pathologie (Zhu et al., 2009).

La protéine dépendante de la vitamine K appelée Gas6 est un ligand commun aux trois récepteurs de la famille des récepteurs TAM (Tyro-3, Axl et Mer). L'activation de Tyro-3 par



Gas6 est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, de la survie et de l'apoptose (Mark et al., 1996; Matsubara et al., 1996; Xiong et al., 2008). L'expression concomitante de Gas6 et des récepteurs TAM a été rapportée dans certains cancers tels que le cancer du sein (Mc et al., 2008), et les gliomes (Hutterer et al., 2008; Vajkoczy et al., 2006); cependant aucun rôle de ces protéines n'a été décrit dans les léiomyosarcomes et le rôle de Tyro-3 reste largement méconnu dans les tumeurs solides humaines.

Ici, nous montrons l'expression de Gas6 dans 61% des tumeurs de léiomyosarcomes analysées et celle de Tyro-3 dans la totalité des tumeurs et les deux lignées cellulaires (SK-LMS-1 et CNIO AA). De façon intéressante, nous observons que la co-expression de Tyro-3 et Gas6 est parfaitement corrélée à la phosphorylation d'Akt dans les 13 tumeurs étudiées et la lignée cellulaire CNIO AA. La corrélation est mutuellement exclusive, l'expression de Gas6 autocrine étant retrouvée uniquement dans les tumeurs fraîches dans lesquelles la voie PI3K/AKT est activée. La même observation est faite dans les deux lignées de léiomyosarcomes étudiées, ou seule CNIO AA, qui exprime Gas6, présente une activation constitutive de la voie PI3K/Akt. L'expression de Tyro-3 est constitutive dans toutes les cellules tumorales étudiées, lignées ou tissus frais, tandis que l'expression de Axl n'est pas constante. Il faut noter que l'activation de la voie PI3K/Akt est indépendante d'une perte de PTEN, que l'on retrouve dans ces tumeurs. Par ailleurs, l'expression de Gas6, et donc l'existence d'une boucle autocrine potentielle, est également associée à la présence d'une activation de la voie MAP kinase, l'expression des MAP Kinases ERK1/2 phosphorylée étant retrouvée positivement corrélée à l'expression de Gas6 également. Ces résultats soulignent la contribution potentielle.

Ces observations, obtenues sur des tumeurs fraîches suggéraient un rôle autocrine potentiel de Tyro-3 et Gas6 dans une partie des léiomyosarcomes. Cependant, pour démontrer cette hypothèse, il était nécessaire d'explorer la fonction de ces protéines sur des lignées cellulaires de léiomyosarcomes : nous avons pu disposer de deux lignées de léiomyosarcomes distinctes, comparables aux deux groupes de léiomyosarcomes observés dans les échantillons de tumeurs analysés : 1°) la lignée CNIO AA, co-exprime de manière spontanée Gas6 (en western blot et en test Elisa dans le surnageant de culture) et Tyro-3, et présente une activation de la voie PI3K/Akt objectivée par la présence de Akt phosphorylée sur S437, 2°) la lignée SK-LMS-1, exprime Tyro-3, mais n'exprime pas la protéine Gas6 en western blot et ne produit pas de concentrations de Gas6 détectables en Elisa dans le surnageant.

Dans la lignée CNIO AA, nous avons montré que l'inhibition concomitante de l'expression des gènes Axl et Tyro-3 par des siRNA conduisait à une inhibition partielle de l'expression de

ces deux protéines, suivie d'une diminution de la viabilité cellulaire, évaluée par un test ATP. L'inhibition est moins patente lorsqu'un seul des deux siRNA anti-récepteur Axl ou Tyro-3 est ajouté en culture. De manière notable, le siRNA dirigé contre Gas6 que nous avons utilisé n'a bloqué que de manière très transitoire la production de Gas6, et n'entraîne pas, seul, de réduction de la viabilité de CNIO AA. En combinaison avec les siRNA anti-récepteurs Axl et Tyro-3, le siRNA anti Gas6, ne majore pas l'inhibition de la viabilité cellulaire. La combinaison des deux siRNA Axl et Tyro-3, n'entraîne pas de diminution significative de la phosphorylation de Akt dans les conditions utilisées.

L'inhibition de l'expression des deux récepteurs n'était pas totale, ce qui pourrait expliquer la constance de l'activité d'Akt. Nous souhaiterions donc étudier l'effet de l'inhibition de l'expression de Tyro-3 et d'Axl en combinaison avec des agents cytotoxiques tels que la doxorubicine, sur la prolifération cellulaire et surtout sur l'induction d'apoptose. Il serait également important de pouvoir analyser le blocage de cette voie de signalisation et de la viabilité cellulaire en utilisant des petites molécules inhibitrices de la tyrosine kinase Tyro-3. Comme nous le soulignons dans l'introduction, peu de molécules sont rapportées capables d'exercer cette fonction. Récemment, l'analyse du profil d'inhibition du foretinib, du BMS777607 et du BMS697, trois molécules inhibitrices des récepteurs tyrosine kinases Met et Alk, a montré que ces molécules inhibaient à des concentrations nanomolaires l'activité enzymatique tyrosine kinase de Axl et Tyro-3. Nous avons sollicité ces trois molécules auprès des industriels concernés et nous prévoyons d'évaluer leurs capacités inhibitrices de la prolifération de la lignée CNIO AA. De même, nous prévoyons d'étudier l'effet anti-tumoral des inhibiteurs de la voie PI3K et de mTOR, et des inhibiteurs de Erk sur la lignée CNIO AA afin de déterminer le rôle respectif de ces deux voies de signalisation dans la prolifération de cette lignée, représentative d'un sous groupe de léiomyosarcomes.

Nos résultats montrent donc la présence d'une boucle de croissance autocrine de Gas6 dans un sous-groupe de léiomyosarcomes. Ils sont cohérents avec ceux rapportés par l'équipe de Taylor qui démontre l'activité transformante de Tyro-3 médiée par la voie PI3K/Akt dans une lignée de cancer du sein (Taylor et al., 1995). Ils sont également à mettre en parallèle avec les travaux de Hernando montrant que l'activation constitutionnelle de la voie PI3K/Akt par perte de PTEN entraîne une hyperplasie des cellules musculaires lisses et l'apparition de léiomyosarcomes abdominaux dans un modèle murin (Hernando et al., 2007). L'activation de la voie PI3K/Akt /mTOR semble être un des éléments importants de l'oncogenèse des léiomyosarcomes et l'activation de cette voie est sous le contrôle du couple Tyro-3/Gas6 dans certaines lignées.

Il est important de noter que l'exposition de la lignée CNIO AA à des anticorps bloquants dirigés contre Gas6 et Tyro-3 n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire, contrairement aux résultats obtenus par l'approche siRNA. Ceci pourrait suggérer que l'interaction ligand-récepteur se produirait, au moins en partie, dans les compartiments intracellulaires de la lignée CNIO AA. Les images de co-localisation de Gas6/Axl et Gas6/Tyro3 ne contredisent pas cette hypothèse, le marquage membranaire restant marginal dans ces lignées. Il serait donc intéressant d'étudier la localisation du complexe Gas6/Tyro-3 et ses voies de régulation intracellulaires. Ces résultats rappellent d'autres observations avec d'autres couples ligand/récepteur, qui peuvent agir selon un mode autocrine intracellulaire (« intracrine »). Ceci a été décrit pour les récepteurs de l'EPO (Hermine et al., 1992), de l'IL-6 dans le myélome multiple (Diamant et al., 1997; Levy et al., 1991), de l'IL-6 dans l'adénocarcinome du rein (notre laboratoire, Alberti et al 2004), mais aussi de KIT muté- dans ce cas sans ligand- dans les cellules de GIST ou les NIH3T3 transfectées (Tabone-Eglinger et al., 2008). Nous reviendrons dans le dernier chapitre de notre discussion sur cette observation qui constitue une partie de notre travail de thèse.

Aucune des tumeurs étudiées ne présente cependant d'activation de la voie mTOR et, de manière intéressante, la lignée SK-LMS-1 paraît représentative de ce sous-groupe de léiomyosarcomes. L'effet inhibiteur de la prolifération cellulaire induit par les siRNA dirigés contre Tyro-3 et Axl n'est en effet pas retrouvé dans la lignée SK-LMS-1, qui exprime Tyro-3 mais pas Gas6. L'exposition de cette lignée à Gas6 exogène induit la phosphorylation de Akt sur S473, mais ne module pas de manière significative la viabilité cellulaire, en présence de sérum, n'augmentant que de manière marginale la viabilité de la lignée en l'absence de sérum. L'absence d'expression de Gas6 dans une partie des tumeurs et dans la lignée SK-LMS-1 et l'induction par Gas6, dans les cellules SK-LMS-1, de la phosphorylation d'Akt montrent le lien étroit entre Gas6 et l'activation de cette voie dans cette lignée, en accord avec nos observations dans les tumeurs.

L'inhibition de la voie Tyro-3/Gas6, et peut-être en aval de la voie PI3K/Akt /mTOR, est donc une stratégie potentielle pour le traitement d'une partie des léiomyosarcomes. Toutefois, il est important de noter les graves conséquences de l'inhibition des récepteurs TAM *in vivo*, dans les modèles animaux. Les souris dont les gènes codant pour les trois récepteurs sont invalidés développent des maladies auto-immunes incluant l'arthrite rhumatoïde et le lupus (Cohen et al., 2002; Lemke and Lu, 2003). De plus, ces souris, très sensibles aux endotoxines, produisent des cytokines pro-inflammatoires (Camenisch et al., 1999; Rothlin et al., 2007). Chez l'homme, des taux réduits de la protéine S circulante ont été retrouvés chez les patients

souffrant d'un lupus érythémateux systémique, suggérant qu'une diminution de signalisation des récepteurs TAM pourrait contribuer à la physiopathologie de cette affection auto-immune (Meesters et al., 2007; Song et al., 2000).

### **Les léiomyosarcomes dérivent des cellules vasculaires musculaires lisses ?**

Dans des conditions physiologiques, Gas6 est exprimé par de nombreux tissus de l'organisme et en particulier par les cellules vasculaires musculaires lisses (CVMLs) (Manfioletti et al., 1993). Dans des conditions pathologiques, Gas6 est surexprimé au niveau des sites d'inflammation, des blessures des vaisseaux et dans les cellules vasculaires musculaires lisses des plaques athérosclérotiques (Luttun and Carmeliet, 2001; Melaragno et al., 1998). Depuis sa découverte initiale dans les fibroblastes en arrêt de croissance, de multiples fonctions ont été attribuées à Gas6, allant de l'inhibition de l'apoptose et de la croissance cellulaire à l'adhésion et à la migration des cellules. Gas6 protège les CVMLs, exprimant Axl, de l'apoptose induite par la déprivation en sérum (Melaragno et al., 2004) et contribue à la physiopathologie de l'athérosclérose. En effet, l'équipe de Murao a montré que Gas6 induisait l'expression des récepteurs « scavengers » qui contribuent à la transformation des CVMLs en cellules spumeuses et au développement de l'athérosclérose (Murao et al., 1999). Gas6 semble jouer un rôle important dans la migration et la survie des CVMLs surexprimant Axl (Fridell et al., 1998; Melaragno et al., 2004).

Dans notre travail, nous montrons une expression de Gas6 et de ses récepteurs Tyro-3/Axl sur des tumeurs fraîches de léiomyosarcomes, ce qui nous amène à poser l'hypothèse qu'une partie des léiomyosarcomes pourrait provenir de la transformation de cellules vasculaires musculaires lisses des organes ou des tissus mous d'où ils surviennent. Classiquement, les léiomyosarcomes peuvent survenir dans toutes les parties du corps, (Berlin et al., 1984): 1) les léiomyosarcomes des tissus mous, qui sont les plus fréquents (S. W. Weiss and J. R. Goldblum, *Leiomyosarcoma in Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*, Mosby, St. Louis, Mo, USA, 4th edition, 2001), 2) les léiomyosarcomes cutanés ayant le meilleur pronostic (El Khoury et al., 2006), 3) les léiomyosarcomes vasculaires, 4) les léiomyosarcomes utérins, 5) les léiomyosarcomes osseux, 6) les léiomyosarcomes viscéraux d'autres topographies (digestifs, pulmonaires, prostatiques).

L'hypothèse qu'une fraction importante des léiomyosarcomes pourrait dériver de cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins pourrait être confortée par une analyse phénotypique comparée des léiomyosarcomes et des CVMLs, ou par des expériences de

transgénèse explorant la surexpression de Gas6 dans des souris. Cependant, nous soulignons que tous les léiomyosarcomes n'expriment pas Gas6 ni la forme phosphorylée de Akt sur S473 et que d'autres mécanismes sont de toute évidence mis en jeu dans la transformation de certaines de ces tumeurs.

Au total, dans la présente étude, nous montrons l'expression de Tyro-3, d'Axl et de leur ligand Gas6 sur des tumeurs fraîches de léiomyosarcomes ainsi que sur la lignée cellulaire CNIO AA. Nous avons également démontré une co-localisation de Gas6 et de ses récepteurs Tyro-3 et Axl dans les cellules de CNIO AA, suggérant une activation de ceux-ci à travers une boucle autocrine dans une partie des léiomyosarcomes.

### **La perte de phosphorylation de FAK Y397 dans les léiomyosarcomes : une perte d'ancrage induite par Gas6 ?**

Dans le profil protéomique que nous avons établi sur les 13 léiomyosarcomes lors de la première étape de notre travail, nous avons pu identifier la perte de la phosphorylation de FAK comme une caractéristique biologique saillante des LMS par rapport au tissu musculaire lisse normal. Cette observation est paradoxale au vu des données de la littérature. Elle est cependant retrouvée lors du travail de clusterisation de ces tumeurs en utilisant ce profil protéomique : en effet nous observons une réduction globale de la phosphorylation de la protéine FAK dans un des sous groupes de LMS ainsi identifié. Dans la plupart des modèles tumoraux étudiés jusqu'à présent pourtant, l'expression de FAK et sa phosphorylation sont retrouvées majorées dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales. Cependant les modèles étudiés sont principalement des tumeurs épithéliales et le rôle de FAK pourrait être différent pour les tumeurs conjonctives (McLean et al., 2005).

FAK (focal adhesion kinase) est une protéine kinase cytoplasmique retrouvée de façon ubiquitaire au sein des complexes d'adhésion, permettant la signalisation entre les protéines de la matrice extracellulaire et la cellule normale ou tumorale. Son activation est induite après interaction des intégrines avec leurs ligands présents dans la matrice extracellulaire mais aussi par différents facteurs de croissance, cytokines ou hormones, interagissant avec leurs récepteurs spécifiques. L'activation de FAK se traduit par l'autophosphorylation de son résidu tyrosine (Y397) libérant un site de liaison pour la protéine Src (Kume et al., 1997; Manes et al., 1999; Schaller et al., 1994; Sieg et al., 2000). Cette phosphorylation libère un site

d'ancrage de forte affinité pour les protéines contenant un domaine SH2. Les kinases de la famille Src, Fyn et c-Src vont ainsi être recrutées et activées sur ce site. Elles vont alors phosphoryler d'autres résidus tyrosine dans le domaine catalytique de FAK (Y407, Y576 et Y577) ainsi que dans la région carboxy-terminale (Y861 et Y925). La phosphorylation des tyrosines Y576 et Y577 par Src augmente l'activité enzymatique de FAK et permet la création de nouveaux sites de liaison pour d'autres effecteurs.

La surexpression de FAK est associée à l'augmentation du potentiel d'invasion des tumeurs humaines en général (McLean et al., 2005; Owens et al., 1995). Dans de multiples modèles tumoraux et tumeurs humaines épithéliales, par exemple les carcinomes ovariens, le niveau d'expression de FAK ainsi que sa phosphorylation sont associés à l'agressivité tumorale (McLean et al., 2005).

Dans notre étude sur les léiomyosarcomes, nous avons observé une perte de phosphorylation de FAK sur le résidu Y397 dans toutes les tumeurs étudiées. Cette observation constituait le meilleur marqueur différentiel entre les tumeurs et le tissu sain contrôle. Sur les lignées cellulaires, la forme déphosphorylée de FAK Y397 a été retrouvée uniquement dans la lignée CNIO AA exprimant fortement Gas6. Nous avons pu montrer que cette perte de phosphorylation de FAK Y397 était liée à la présence de Gas6. Nous observons en revanche la phosphorylation de FAK sur Y397 dans la lignée SK-LMS-1, qui n'exprime pas Gas6. L'addition de Gas6 exogène est associée dans cette lignée à une perte de la phosphorylation de FAK sur Y397 ; dans la lignée CNIO AA, nous observons que la privation en sérum ré-induit la phosphorylation de FAK sur Y397, tandis que l'addition de Gas6 exogène dans ces mêmes conditions induit à nouveau une perte de la phosphorylation de FAK Y397. Cette observation contraste avec les données de la littérature qui rapportent une induction de l'activation de FAK sur Y397 par les cytokines et les facteurs de croissance. Cependant, une étude rejoint nos observations dans ce contexte, celle de l'équipe de Lu Z, qui montre une déphosphorylation de FAK Y397 après stimulation d'une lignée de carcinome par l'EGF. Dans ce modèle, une perte d'adhérence et une augmentation de la migration cellulaire ont été observées, favorisant ainsi l'invasion tumorale (Lu et al., 2001).

Quel pourrait être le mécanisme de la déphosphorylation de FAK dans les léiomyosarcomes ? Il est rapporté que les protéines tyrosine phosphatases telles que SHP-2, PTEN, PTP-1B et PTP-PEST sont impliquées d'une manière directe ou indirecte dans la déphosphorylation de FAK et de p130<sup>cas</sup> (Garton and Tonks, 1999; Hassid et al., 1999; Maher, 1993; Tamura et al., 1999). De façon intéressante, il a été décrit que la déphosphorylation de FAK est induite par les protéines tyrosines phosphatases lors de l'activation des RTKs par leurs ligands

spécifiques, tels que l'IGF-1 R et l'EphA2 (Guvakova and Surmacz, 1999; Miao et al., 2000). L'activation de l'IGF-1R conduit à la déphosphorylation de FAK, de p130<sup>cas</sup> et de la paxilline, ainsi qu'à l'augmentation de la migration et de l'invasion des cellules MCF-7, suggérant un rôle important de la déphosphorylation de FAK, induite par la stimulation de facteurs de croissance, dans la migration et l'invasion cellulaire. De manière similaire, nous observons une déphosphorylation de FAK Y397 dans la lignée CNIO AA présentant une activation de Tyro-3/Axl par Gas6.

Il nous semble donc intéressant de mieux explorer le rôle de Gas6 dans la déphosphorylation de FAK et dans la motilité et la migration des cellules de léiomyosarcomes. Ces observations indiquent que le rôle de FAK dans la migration cellulaire et dans la prolifération est complexe et dépend largement du modèle tumoral et de l'environnement de la cellule. Des inhibiteurs de FAK sont actuellement étudiés en clinique, mais on peut soupçonner que leur développement va se heurter à la multiplicité des fonctions de cette molécule selon les modèles. En effet, la prolifération tumorale ou la capacité de migration sont associées, dans différents modèles, à l'activation ou à l'inactivation de la kinase.

### **Impact des mutations activatrices de KIT sur le trafic intracellulaire de la protéine**

Nos résultats mettent en évidence un possible rôle autocrine de Gas6 sur certaines lignées et tumeurs fraîches de léiomyosarcomes et dans la lignée CNIO AA. L'analyse de la localisation du récepteur et de son ligand montre une expression cytoplasmique plutôt que membranaire des deux molécules associées. Le mode de fonctionnement autocrine « *intracrine* » de facteurs de croissance a déjà été rapporté dans plusieurs modèles physiologiques et tumoraux (EPO, IL-6). Dans notre deuxième article nous montrons que ce processus concerne également le récepteur KIT, porteur de mutations caractéristiques des tumeurs de type GIST.

Les GISTs sont devenus une entité nosologique à part entière depuis la découverte en 1998 de mutations activatrices du récepteur KIT dans des formes familiales et sporadiques de GIST. (CD117) (Hirota et al., 1998). Antérieurement, les GISTs étaient fréquemment confondus avec les léiomyosarcomes. Actuellement, on admet que les GIST correspondent à la transformation de cellules interstitielles de Cajal, cellules responsables du péristaltisme du tube digestif exprimant le récepteur KIT, ou d'un précurseur commun qu'elles partageraient avec les cellules musculaires lisses de la motricité intestinale (Kindblom et al., 1998). Depuis 2001, après la mise en évidence de l'effet anti-tumoral de l'imatinib (Blanke et al., 2008;

Demetri et al., 2002; Joensuu et al., 2001; Verweij et al., 2004), cette tumeur est devenue le modèle paradigme des thérapeutiques ciblées des tumeurs solides, et aussi pour la recherche de cibles moléculaires dans les autres types de sarcomes. Les mécanismes moléculaires de la résistance au traitement sont multiples : il a été montré que la survie des patients suite au traitement était corrélée à la topographie de la mutation sur le gène *KIT* et donc sur la protéine KIT, possiblement à la nature de la mutation lorsqu'elle concerne par exemple l'exon 11 (codons 557\_558, vs plus distale), à l'émergence de mutations secondaires de *KIT* codant pour des protéines résistantes à l'imatinib (Debiec-Rychter et al., 2004; DeMatteo et al., 2007; Heinrich et al., 2003a). Il est cependant établi que l'expression de la kinase cible n'est pas suffisante pour prédire la réponse à l'inhibiteur et que la kinase est exprimée fréquemment de manière intracytosolique dans certaines tumeurs en analyse immunohistochimique (Sciot et al., 2008).

Dans ce contexte, dans notre travail faisant l'objet de l'article 2 (Tabone-Eglinger et al., 2008), nous avons examiné la localisation subcellulaire de la kinase KIT normale et de la kinase mutée dans un modèle, artificiel, de NIH3T3 transfectées par la forme sauvage du gène *KIT* ou par les formes mutées de KIT D6 (délétion des codons 557 et 558), et D54 (délétion de 18 codons plus en aval de l'exon 11). Nous avons démontré que les mutations de *KIT* induisaient une altération de la maturation et du trafic intracellulaire de la protéine. Ceci conduit à une rétention intracellulaire d'une forme immature de KIT (125 kDa), présente dans les compartiments intracellulaires dans un état actif. De même, l'expression de la forme membranaire de KIT est réduite chez les GISTs mutants (Bachet et al., 2009) comparés aux GIST porteurs de gènes *KIT* non mutés, alors que l'expression de l'ARNm de KIT était équivalente dans les deux cas. De façon intéressante, nous observons que l'imatinib bloque ce phénomène tout en restaurant l'expression *membranaire*, mais non activée, de la forme immature de KIT. L'ensemble de ces résultats pourrait donc expliquer le manque de corrélation entre l'expression membranaire de KIT et la réponse à l'imatinib (Sciot et al., 2008).

De manière importante, ces résultats illustrent une nouvelle fois l'existence d'altérations du trafic intracellulaire des protéines de type récepteur tyrosine kinase mutés, quelle que soit la nature du récepteur membranaire et de la cytokine en cause. Un mode de fonctionnement intracrine a ainsi été rapporté avec les hématopoïétines (EPO, IL-6), agissant par un mode autocrine- intracrine du fait de l'augmentation conjointe de l'expression du récepteur et de son ligand dans l'adénocarcinome du rein et le myélome. Dans ces modèles, les récepteurs en cause ne sont pas des récepteurs tyrosine kinase, mais des récepteurs couplés, transduisant le



signal grâce à l'interaction avec les molécules de la famille des Janus kinases. Nous soupçonnons un fonctionnement similaire de la boucle autocrine que nous décrivons pour Gas6 et Tyro-3 dans la mesure où 1°) nous observons une co-localisation intracellulaire de la cytokine et de ses récepteurs Tyro3 et Axl, 2°) les anticorps anti récepteurs et anti Gas6 ne permettent pas de moduler la viabilité ni la prolifération cellulaire ni la signalisation via Akt, tandis que 3°) les siRNA bloquent l'expression de Tyro-3 et Axl et affectent la viabilité cellulaire. Dans le présent modèle, le récepteur Tyro-3, dont l'expression n'est pas limitée aux compartiments intracellulaires, est présent et fonctionnel à la membrane plasmique, dans la mesure où Gas6 exogène module l'expression et la phosphorylation de plusieurs protéines (Akt et FAK notamment). Il sera intéressant de confirmer notre hypothèse dans les lignées de LMS en utilisant des petites molécules inhibitrices des tyrosine kinases Axl et Tyro-3 et d'analyser la topographie du ligand et de ses deux récepteurs en microscopie confocale, comme cela a pu être réalisé pour KIT sur les cellules NIH3T3 transfectées.

Un mode de fonctionnement intracrine est donc démontré également avec le récepteur *KIT* muté dans ce travail, ajoutant ainsi à la liste des récepteurs agissant selon un mode intracrine, ce modèle où le récepteur est activé indépendamment du ligand.

La signification biologique de la délocalisation dans les compartiments intracellulaires des récepteurs mutés activés ou des récepteurs/ligands produits selon un mode autocrine reste à établir. Nous testerons, dans la suite de ce travail, l'hypothèse selon laquelle cette délocalisation pourrait leur permettre d'échapper aux systèmes de rétrocontrôles physiologiques de leur fonction notamment l'internalisation et la déphosphorylation par des enzymes spécifiques.

## **Perspectives**

Le travail que nous avons présenté nous ouvre plusieurs perspectives.

Tout d'abord, il nous semble important d'évaluer l'expression de Tyro-3 sur une plus grande série de tumeurs de léiomyosarcome, en utilisant la même approche protéomique. Une analyse portant sur une série de 30 léiomyosarcomes est en cours. Cette série de tumeurs comprend 10 LMS indifférenciées (G3), 10 tumeurs peu différenciées (G2) et 10 tumeurs bien différenciées (G1), selon une classification génomique par CGH array réalisée par l'équipe d'Alain Aurias à l'institut Curie à Paris.

Nous nous proposons de déterminer si nous retrouvons ces trois mêmes groupes de LMS classés selon des profils d'expression protéiques. Cette approche devra être couplée à une analyse à plus large échelle, par exemple sur les TMA, de l'expression de Tyro-3 et de Gas6 en immunohistochimie et également de Axl et des éléments de la voie de signalisation PI3K/Akt et mTOR, par exemple P-Akt ou P-p70S6.

L'utilisation des inhibiteurs tyrosine kinases ciblant Tyro-3 et Axl tels que les molécules BMS 777607, BMS-796302 et le Foretinib, seuls ou combinés à des agents cytotoxiques sera évaluée dans les cellules de LMS *in vitro*. Cette approche pourrait être également évaluée chez l'animal *in vivo*.

Nous étudierons de même, le rôle de FAK dans la migration des cellules de léiomyosarcome, en explorant des inhibiteurs spécifiques sur des lignées exprimant FAK phosphorylée telles que SK-LMS-1, et l'implication de Gas6 dans cette voie.

Nous nous proposons en outre de poursuivre ce travail par une recherche de mutations et d'amplification génique de Tyro-3 et de Axl et de l'ensemble des 58 RTK du génome humain sur une série de LMS, afin d'explorer la présence possible de mutations activatrices ou d'autres mécanismes d'activation en sus de la surexpression conjointe du ligand et de son récepteur.

Enfin nous explorerons plus en détail le rôle potentiel de PKC theta, également retrouvé surexprimé spécifiquement dans les 13 LMS étudiés, et dont nous allons étudier le niveau d'expression dans la série de validation de 30 tumeurs en cours d'analyse, ainsi que sur les lignées tumorales CNIO AA et SK-LMS-1 que nous avons utilisées comme modèles dans nos travaux.

L'approche séquentielle, protéomique, puis analyse fonctionnelle s'est révélée fructueuse pour identifier une cible thérapeutique potentielle dans une tumeur dont la biologie reste encore imparfaitement comprise. Nous pensons que l'application de ce type d'approche protéique serait également intéressante dans les autres types de sarcomes afin de mieux les caractériser sur le plan protéique en identifiant des voies de signalisation activées.

## **Conclusion**

Nos travaux ont montré l'intérêt de l'approche protéomique dans l'identification de cibles thérapeutiques dans les cancers, notamment les léiomyosarcomes. Nous avons apporté de nouvelles données fondamentales pour la compréhension des voies de signalisation intracellulaires de ces tumeurs agressives, mal caractérisées sur le plan moléculaire. Ces

résultats ouvrent des perspectives pour la recherche de cibles moléculaires dans les sarcomes à génétique complexe en utilisant de telles approches.

# **Annexes**

# Références

## Reference List

- Alaiya,A.A., Franzen,B., Hagman,A., Dysvik,B., Roblick,U.J., Becker,S., Moberger,B., Auer,G., and Linder,S. (2002). Molecular classification of borderline ovarian tumors using hierarchical cluster analysis of protein expression profiles. *Int. J. Cancer* 98, 895-899.
- Allander,S.V., Illei,P.B., Chen,Y., Antonescu,C.R., Bittner,M., Ladanyi,M., and Meltzer,P.S. (2002). Expression profiling of synovial sarcoma by cDNA microarrays: association of ERBB2, IGFBP2, and ELF3 with epithelial differentiation. *Am. J. Pathol.* 161, 1587-1595.
- Allen,M.P., Linseman,D.A., Udo,H., Xu,M., Schaack,J.B., Varnum,B., Kandel,E.R., Heidenreich,K.A., and Wierman,M.E. (2002). Novel mechanism for gonadotropin-releasing hormone neuronal migration involving Gas6/Ark signaling to p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 22, 599-613.
- Allen,M.P., Zeng,C., Schneider,K., Xiong,X., Meintzer,M.K., Bellosta,P., Basilico,C., Varnum,B., Heidenreich,K.A., and Wierman,M.E. (1999). Growth arrest-specific gene 6 (Gas6)/adhesion related kinase (Ark) signaling promotes gonadotropin-releasing hormone neuronal survival via extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Akt. *Mol. Endocrinol.* 13, 191-201.
- Anderson,H.A., Maylock,C.A., Williams,J.A., Paweletz,C.P., Shu,H., and Shacter,E. (2003). Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat. Immunol.* 4, 87-91.
- Andersson,S., D'Arcy,P., Larsson,O., and Sehat,B. (2009). Focal adhesion kinase (FAK) activates and stabilizes IGF-1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 36-41.
- Andl,C.D. and Rustgi,A.K. (2005). No one-way street: cross-talk between e-cadherin and receptor tyrosine kinase (RTK) signaling: a mechanism to regulate RTK activity. *Cancer Biol. Ther.* 4, 28-31.
- Angelillo-Scherrer,A., Burnier,L., Flores,N., Savi,P., DeMol,M., Schaeffer,P., Herbert,J.M., Lemke,G., Goff,S.P., Matsushima,G.K., Earp,H.S., Vesin,C., Hoylaerts,M.F., Plaisance,S., Collen,D., Conway,E.M., Wehrle-Haller,B., and Carmeliet,P. (2005). Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J. Clin. Invest* 115, 237-246.
- Angelillo-Scherrer,A., de Frutos,P., Aparicio,C., Melis,E., Savi,P., Lupu,F., Arnout,J., Dewerchin,M., Hoylaerts,M., Herbert,J., Collen,D., Dahlback,B., and Carmeliet,P. (2001). Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat. Med.* 7, 215-221.
- Antman,K., Crowley,J., Balcerzak,S.P., Rivkin,S.E., Weiss,G.R., Elias,A., Natale,R.B., Cooper,R.M., Barlogie,B., Trump,D.L., and . (1993). An intergroup phase III randomized

study of doxorubicin and dacarbazine with or without ifosfamide and mesna in advanced soft tissue and bone sarcomas. *J. Clin. Oncol.* *11*, 1276-1285.

Arevalo,J.C., Waite,J., Rajagopal,R., Beyna,M., Chen,Z.Y., Lee,F.S., and Chao,M.V. (2006). Cell survival through Trk neurotrophin receptors is differentially regulated by ubiquitination. *Neuron* *50*, 549-559.

Bachet,J.B., Hostein,I., Le Cesne,A., Brahimi,S., Beauchet,A., Tabone-Eglinger,S., Subra,F., Bui,B., Duffaud,F., Terrier,P., Coindre,J.M., Blay,J.Y., and Emile,J.F. (2009). Prognosis and predictive value of KIT exon 11 deletion in GISTs. *Br. J. Cancer* *101*, 7-11.

Baird,K., Davis,S., Antonescu,C.R., Harper,U.L., Walker,R.L., Chen,Y., Glatfelter,A.A., Duray,P.H., and Meltzer,P.S. (2005). Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer Res.* *65*, 9226-9235.

Balana,M.E., Labriola,L., Salatino,M., Movsichoff,F., Peters,G., Charreau,E.H., and Elizalde,P.V. (2001). Activation of ErbB-2 via a hierarchical interaction between ErbB-2 and type I insulin-like growth factor receptor in mammary tumor cells. *Oncogene* *20*, 34-47.

Behrens,E.M., Gadue,P., Gong,S.Y., Garrett,S., Stein,P.L., and Cohen,P.L. (2003). The mer receptor tyrosine kinase: expression and function suggest a role in innate immunity. *Eur. J. Immunol.* *33*, 2160-2167.

Bellosta,P., Costa,M., Lin,D.A., and Basilico,C. (1995). The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol. Cell Biol.* *15*, 614-625.

Bellosta,P., Zhang,Q., Goff,S.P., and Basilico,C. (1997). Signaling through the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation. *Oncogene* *15*, 2387-2397.

Bennasroune,A., Gardin,A., Aunis,D., Cremel,G., and Hubert,P. (2004). Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* *50*, 23-38.

Berclaz,G., Altermatt,H.J., Rohrbach,V., Kieffer,I., Dreher,E., and Andres,A.C. (2001). Estrogen dependent expression of the receptor tyrosine kinase axl in normal and malignant human breast. *Ann. Oncol.* *12*, 819-824.

Berlin,O., Stener,B., Kindblom,L.G., and Angervall,L. (1984). Leiomyosarcomas of venous origin in the extremities. A correlated clinical, roentgenologic, and morphologic study with diagnostic and surgical implications. *Cancer* *54*, 2147-2159.

Binh,M.B., Sastre-Garau,X., Guillou,L., de Pinieux,G., Terrier,P., Lagace,R., Aurias,A., Hostein,I., and Coindre,J.M. (2005). MDM2 and CDK4 immunostainings are useful adjuncts in diagnosing well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma subtypes: a comparative analysis of 559 soft tissue neoplasms with genetic data. *Am. J. Surg. Pathol.* *29*, 1340-1347.

Birchmeier,C., Birchmeier,W., Gherardi,E., and Vande Woude,G.F. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 915-925.

Bladt,F., Riethmacher,D., Isenmann,S., Aguzzi,A., and Birchmeier,C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* *376*, 768-771.

Blanke,C.D., Rankin,C., Demetri,G.D., Ryan,C.W., von Mehren,M., Benjamin,R.S., Raymond,A.K., Bramwell,V.H., Baker,L.H., Maki,R.G., Tanaka,M., Hecht,J.R., Heinrich,M.C., Fletcher,C.D., Crowley,J.J., and Borden,E.C. (2008). Phase III randomized, intergroup trial assessing imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing the kit receptor tyrosine kinase: S0033. *J. Clin. Oncol.* *26*, 626-632.

Blay,J.Y., Bonvalot,S., Casali,P., Choi,H., Debiec-Richter,M., Dei Tos,A.P., Emile,J.F., Gronchi,A., Hogendoorn,P.C., Joensuu,H., Le Cesne,A., McClure,J., Maurel,J., Nupponen,N., Ray-Coquard,I., Reichardt,P., Sciot,R., Stroobants,S., van Glabbeke,M., van Oosterom,A., and Demetri,G.D. (2005a). Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors. Report of the GIST Consensus Conference of 20-21 March 2004, under the auspices of ESMO. *Ann. Oncol.* *16*, 566-578.

Blay,J.Y., El Sayadi,H., Thiesse,P., Garret,J., and Ray-Coquard,I. (2008). Complete response to imatinib in relapsing pigmented villonodular synovitis/tenosynovial giant cell tumor (PVNS/TGCT). *Ann. Oncol.* *19*, 821-822.

Blay,J.Y., Le Cesne,A., Alberti,L., and Ray-Coquard,I. (2005b). Targeted cancer therapies. *Bull. Cancer* *92*, E13-E18.

Blay,J.Y., van Glabbeke,M., Verweij,J., van Oosterom,A.T., Le Cesne,A., Oosterhuis,J.W., Judson,I., and Nielsen,O.S. (2003). Advanced soft-tissue sarcoma: a disease that is potentially curable for a subset of patients treated with chemotherapy. *Eur. J. Cancer* *39*, 64-69.

Blay,P., Astudillo,A., Buesa,J.M., Campo,E., Abad,M., Garcia-Garcia,J., Miquel,R., Marco,V., Sierra,M., Losa,R., Lacave,A., Brana,A., Balbin,M., and Freije,J.M. (2004). Protein kinase C theta is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors but not in other mesenchymal neoplasias. *Clin. Cancer Res.* *10*, 4089-4095.

Blume-Jensen,P. and Hunter,T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* *411*, 355-365.

Bogdanova,N., Cybulski,C., Bermisheva,M., Datsyuk,I., Yamini,P., Hillemanns,P., Antonenkova,N.N., Khusnutdinova,E., Lubinski,J., and Dork,T. (2009). A nonsense mutation (E1978X) in the ATM gene is associated with breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *118*, 207-211.

Boghosian,L., Dal Cin,P., Turc-Carel,C., Rao,U., Karakousis,C., Sait,S.J., and Sandberg,A.A. (1989). Three possible cytogenetic subgroups of leiomyosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* *43*, 39-49.

Bonvalot,S., Eldweny,H., Haddad,V., Rimareix,F., Missenard,G., Oberlin,O., Vanel,D., Terrier,P., Blay,J.Y., Le Cesne,A., and Le Pechoux,C. (2008). Extra-abdominal primary fibromatosis: Aggressive management could be avoided in a subgroup of patients. *Eur. J. Surg. Oncol.* *34*, 462-468.

Borges,E., Jan,Y., and Ruoslahti,E. (2000). Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain. *J. Biol. Chem.* *275*, 39867-39873.

- Budagian,V., Bulanova,E., Orinska,Z., Thon,L., Mamat,U., Bellosta,P., Basilico,C., Adam,D., Paus,R., and Bulfone-Paus,S. (2005). A promiscuous liaison between IL-15 receptor and Axl receptor tyrosine kinase in cell death control. *EMBO J.* *24*, 4260-4270.
- Burchert,A., Attar,E.C., McCloskey,P., Fridell,Y.W., and Liu,E.T. (1998). Determinants for transformation induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Oncogene* *16*, 3177-3187.
- Camenisch,T.D., Koller,B.H., Earp,H.S., and Matsushima,G.K. (1999). A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF-alpha production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J. Immunol.* *162*, 3498-3503.
- Cance,W.G., Brennan,M.F., Dudas,M.E., Huang,C.M., and Cordon-Cardo,C. (1990). Altered expression of the retinoblastoma gene product in human sarcomas. *N. Engl. J. Med.* *323*, 1457-1462.
- Cance,W.G., Harris,J.E., Iacocca,M.V., Roche,E., Yang,X., Chang,J., Simkins,S., and Xu,L. (2000). Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin. Cancer Res.* *6*, 2417-2423.
- Caraux,A., Lu,Q., Fernandez,N., Riou,S., Di Santo,J.P., Raulet,D.H., Lemke,G., and Roth,C. (2006). Natural killer cell differentiation driven by Tyro3 receptor tyrosine kinases. *Nat. Immunol.* *7*, 747-754.
- Casali,P.G., Jost,L., Reichardt,P., Schlemmer,M., and Blay,J.Y. (2008). Gastrointestinal stromal tumors: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* *19 Suppl 2*, ii35-ii38.
- Casci,T., Vinos,J., and Freeman,M. (1999). Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell* *96*, 655-665.
- Challier,C., Uphoff,C.C., Janssen,J.W., and Drexler,H.G. (1996). Differential expression of the ufo/axl oncogene in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* *10*, 781-787.
- Chen,C.H., Wang,W.J., Kuo,J.C., Tsai,H.C., Lin,J.R., Chang,Z.F., and Chen,R.H. (2005). Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. *EMBO J.* *24*, 294-304.
- Chen,G., Gharib,T.G., Huang,C.C., Taylor,J.M., Misek,D.E., Kardia,S.L., Giordano,T.J., Iannettoni,M.D., Orringer,M.B., Hanash,S.M., and Beer,D.G. (2002). Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol. Cell Proteomics.* *1*, 304-313.
- Chen,J., Carey,K., and Godowski,P.J. (1997). Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene* *14*, 2033-2039.
- Chung,B.I., Malkowicz,S.B., Nguyen,T.B., Libertino,J.A., and McGarvey,T.W. (2003). Expression of the proto-oncogene Axl in renal cell carcinoma. *DNA Cell Biol.* *22*, 533-540.
- Clark,M.A., Fisher,C., Judson,I., and Thomas,J.M. (2005). Soft-tissue sarcomas in adults. *N. Engl. J. Med.* *353*, 701-711.



- Cobrinik,D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24, 2796-2809.
- Cohen,P.L., Caricchio,R., Abraham,V., Camenisch,T.D., Jennette,J.C., Roubey,R.A., Earp,H.S., Matsushima,G., and Reap,E.A. (2002). Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *J. Exp. Med.* 196, 135-140.
- Coindre,J.M., Terrier,P., Bui,N.B., Bonichon,F., Collin,F., Le,D., V, Mandard,A.M., Vilain,M.O., Jacquemier,J., Duplay,H., Sastre,X., Barlier,C., Henry-Amar,M., Mace-Lesech,J., and Contesso,G. (1996). Prognostic factors in adult patients with locally controlled soft tissue sarcoma. A study of 546 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *J. Clin. Oncol.* 14, 869-877.
- Coindre,J.M., Terrier,P., Guillou,L., Le,D., V, Collin,F., Ranchere,D., Sastre,X., Vilain,M.O., Bonichon,F., and N'Guyen,B.B. (2001). Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: a study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *Cancer* 91, 1914-1926.
- Corless,C.L., Fletcher,J.A., and Heinrich,M.C. (2004). Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J. Clin. Oncol.* 22, 3813-3825.
- Craven,R.J., Xu,L.H., Weiner,T.M., Fridell,Y.W., Dent,G.A., Srivastava,S., Varnum,B., Liu,E.T., and Cance,W.G. (1995). Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon cancer. *Int. J. Cancer* 60, 791-797.
- Crosier,K.E. and Crosier,P.S. (1997). New insights into the control of cell growth; the role of the AxI family. *Pathology* 29, 131-135.
- Crosier,P.S., Freeman,S.A., Orlic,D., Bodine,D.M., and Crosier,K.E. (1996). The Dtk receptor tyrosine kinase, which binds protein S, is expressed during hematopoiesis. *Exp. Hematol.* 24, 318-323.
- Crosier,P.S., Hall,L.R., Vitas,M.R., Lewis,P.M., and Crosier,K.E. (1995). Identification of a novel receptor tyrosine kinase expressed in acute myeloid leukemic blasts. *Leuk. Lymphoma* 18, 443-449.
- Cui,J.W., Wang,J., He,K., Jin,B.F., Wang,H.X., Li,W., Kang,L.H., Hu,M.R., Li,H.Y., Yu,M., Shen,B.F., Wang,G.J., and Zhang,X.M. (2004). Proteomic analysis of human acute leukemia cells: insight into their classification. *Clin. Cancer Res.* 10, 6887-6896.
- Cullinane,C., Thorner,P.S., Greenberg,M.L., Kwan,Y., Kumar,M., and Squire,J. (1992). Molecular genetic, cytogenetic, and immunohistochemical characterization of alveolar soft-part sarcoma. Implications for cell of origin. *Cancer* 70, 2444-2450.
- Cupp,J.S., Miller,M.A., Montgomery,K.D., Nielsen,T.O., O'Connell,J.X., Huntsman,D., van de,R.M., Gilks,C.B., and West,R.B. (2007). Translocation and expression of CSF1 in pigmented villonodular synovitis, tenosynovial giant cell tumor, rheumatoid arthritis and other reactive synovitides. *Am. J. Surg. Pathol.* 31, 970-976.
- D'Cruz,P.M., Yasumura,D., Weir,J., Matthes,M.T., Abderrahim,H., LaVail,M.M., and Vollrath,D. (2000). Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum. Mol. Genet.* 9, 645-651.

- Dahl,I. and Angervall,L. (1974). Cutaneous and subcutaneous leiomyosarcoma. A clinicopathologic study of 47 patients. *Pathol. Eur.* 9, 307-315.
- Dai,W., Pan,H., Hassanain,H., Gupta,S.L., and Murphy,M.J., Jr. (1994). Molecular cloning of a novel receptor tyrosine kinase, *tif*, highly expressed in human ovary and testis. *Oncogene* 9, 975-979.
- Danilkovitch-Miagkova,A. and Leonard,E.J. (2001). Cross-talk between RON receptor tyrosine kinase and other transmembrane receptors. *Histol. Histopathol.* 16, 623-631.
- Davis,R.J., D'Cruz,C.M., Lovell,M.A., Biegel,J.A., and Barr,F.G. (1994). Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* 54, 2869-2872.
- De Vos,J., Couderc,G., Tarte,K., Jourdan,M., Requirand,G., Delteil,M.C., Rossi,J.F., Mechti,N., and Klein,B. (2001). Identifying intercellular signaling genes expressed in malignant plasma cells by using complementary DNA arrays. *Blood* 98, 771-780.
- Debiec-Rychter,M., Dumez,H., Judson,I., Wasag,B., Verweij,J., Brown,M., Dimitrijevic,S., Sciot,R., Stul,M., Vranck,H., Scurr,M., Hagemeyer,A., van Glabbeke,M., and van Oosterom,A.T. (2004). Use of c-KIT/PDGFR $\alpha$  mutational analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours entered on phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur. J. Cancer* 40, 689-695.
- Dei Tos,A.P., Maestro,R., Doglioni,C., Piccinin,S., Libera,D.D., Boiocchi,M., and Fletcher,C.D. (1996). Tumor suppressor genes and related molecules in leiomyosarcoma. *Am. J. Pathol.* 148, 1037-1045.
- DeMatteo,R.P., Maki,R.G., Singer,S., Gonen,M., Brennan,M.F., and Antonescu,C.R. (2007). Results of tyrosine kinase inhibitor therapy followed by surgical resection for metastatic gastrointestinal stromal tumor. *Ann. Surg.* 245, 347-352.
- Demetri,G.D., von Mehren,M., Blanke,C.D., Van den Abbeele,A.D., Eisenberg,B., Roberts,P.J., Heinrich,M.C., Tuveson,D.A., Singer,S., Janicek,M., Fletcher,J.A., Silverman,S.G., Silberman,S.L., Capdeville,R., Kiese,B., Peng,B., Dimitrijevic,S., Druker,B.J., Corless,C., Fletcher,C.D., and Joensuu,H. (2002). Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N. Engl. J. Med.* 347, 472-480.
- Derre,J., Lagace,R., Nicolas,A., Mairal,A., Chibon,F., Coindre,J.M., Terrier,P., Sastre,X., and Aurias,A. (2001). Leiomyosarcomas and most malignant fibrous histiocytomas share very similar comparative genomic hybridization imbalances: an analysis of 27 leiomyosarcomas. *Lab Invest* 81, 211-215.
- Dewar,A.L., Cambareri,A.C., Zannettino,A.C., Miller,B.L., Doherty,K.V., Hughes,T.P., and Lyons,A.B. (2005). Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib. *Blood* 105, 3127-3132.
- Deyrup,A.T., Tretiakova,M., and Montag,A.G. (2006). Estrogen receptor-beta expression in extraabdominal fibromatoses: an analysis of 40 cases. *Cancer* 106, 208-213.

- Diamant,M., Rieneck,K., Mechti,N., Zhang,X.G., Svenson,M., Bendtzen,K., and Klein,B. (1997). Cloning and expression of an alternatively spliced mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 signal transducer gp130. *FEBS Lett.* *412*, 379-384.
- Doherty,J.K., Bond,C., Jardim,A., Adelman,J.P., and Clinton,G.M. (1999). The HER-2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 10869-10874.
- Drobnjak,M., Latres,E., Pollack,D., Karpeh,M., Dudas,M., Woodruff,J.M., Brennan,M.F., and Cordon-Cardo,C. (1994). Prognostic implications of p53 nuclear overexpression and high proliferation index of Ki-67 in adult soft-tissue sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.* *86*, 549-554.
- Du,K.L., Ip,H.S., Li,J., Chen,M., Dandre,F., Yu,W., Lu,M.M., Owens,G.K., and Parmacek,M.S. (2003). Myocardin is a critical serum response factor cofactor in the transcriptional program regulating smooth muscle cell differentiation. *Mol. Cell Biol.* *23*, 2425-2437.
- Dwek,M.V. and Alaiya,A.A. (2003). Proteome analysis enables separate clustering of normal breast, benign breast and breast cancer tissues. *Br. J. Cancer* *89*, 305-307.
- Edmonson,J.H., Ryan,L.M., Blum,R.H., Brooks,J.S., Shiraki,M., Frytak,S., and Parkinson,D.R. (1993). Randomized comparison of doxorubicin alone versus ifosfamide plus doxorubicin or mitomycin, doxorubicin, and cisplatin against advanced soft tissue sarcomas. *J. Clin. Oncol.* *11*, 1269-1275.
- Egan,J.E., Hall,A.B., Yatsula,B.A., and Bar-Sagi,D. (2002). The bimodal regulation of epidermal growth factor signaling by human Sprouty proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 6041-6046.
- Ek,S., Hogerkorp,C.M., Dictor,M., Ehinger,M., and Borrebaeck,C.A. (2002). Mantle cell lymphomas express a distinct genetic signature affecting lymphocyte trafficking and growth regulation as compared with subpopulations of normal human B cells. *Cancer Res.* *62*, 4398-4405.
- Ekstrand,A.J., James,C.D., Cavenee,W.K., Seliger,B., Pettersson,R.F., and Collins,V.P. (1991). Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res.* *51*, 2164-2172.
- El Khoury,M., Mesurole,B., Trassard,M., Cherel,P., Talma,V., and Hagay,C. (2006). Leiomyosarcoma of the great saphenous vein. *Australas. Radiol.* *50*, 500-503.
- El Rifai,W., Sarlomo-Rikala,M., Knuutila,S., and Miettinen,M. (1998). DNA copy number changes in development and progression in leiomyosarcomas of soft tissues. *Am. J. Pathol.* *153*, 985-990.
- Epstein,J.A., Shapiro,D.N., Cheng,J., Lam,P.Y., and Maas,R.L. (1996). Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 4213-4218.

- Ericson,K., Engellau,J., Persson,A., Lindblom,A., Domanski,H., Akerman,M., and Nilbert,M. (2004). Immunohistochemical Loss of the DNA Mismatch Repair Proteins MSH2 and MSH6 in Malignant Fibrous Histiocytomas. *Sarcoma*. 8, 123-127.
- Esposito,C.L., D'Alessio,A., de,F., V, and Cerchia,L. (2008). A cross-talk between TrkB and Ret tyrosine kinases receptors mediates neuroblastoma cells differentiation. *PLoS. One*. 3, e1643.
- Evans,C.O., Young,A.N., Brown,M.R., Brat,D.J., Parks,J.S., Neish,A.S., and Oyesiku,N.M. (2001). Novel patterns of gene expression in pituitary adenomas identified by complementary deoxyribonucleic acid microarrays and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86, 3097-3107.
- Falcioni,R., Antonini,A., Nistico,P., Di Stefano,S., Crescenzi,M., Natali,P.G., and Sacchi,A. (1997). Alpha 6 beta 4 and alpha 6 beta 1 integrins associate with ErbB-2 in human carcinoma cell lines. *Exp. Cell Res.* 236, 76-85.
- Farshid,G., Pradhan,M., Goldblum,J., and Weiss,S.W. (2002). Leiomyosarcoma of somatic soft tissues: a tumor of vascular origin with multivariate analysis of outcome in 42 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 26, 14-24.
- Faust,M., Ebensperger,C., Schulz,A.S., Schleithoff,L., Hameister,H., Bartram,C.R., and Janssen,J.W. (1992). The murine ufo receptor: molecular cloning, chromosomal localization and in situ expression analysis. *Oncogene* 7, 1287-1293.
- Fiorentino,L., Pertica,C., Fiorini,M., Talora,C., Crescenzi,M., Castellani,L., Alema,S., Benedetti,P., and Segatto,O. (2000). Inhibition of ErbB-2 mitogenic and transforming activity by RALT, a mitogen-induced signal transducer which binds to the ErbB-2 kinase domain. *Mol. Cell Biol.* 20, 7735-7750.
- Fiorini,M., Ballaro,C., Sala,G., Falcone,G., Alema,S., and Segatto,O. (2002). Expression of RALT, a feedback inhibitor of ErbB receptors, is subjected to an integrated transcriptional and post-translational control. *Oncogene* 21, 6530-6539.
- Fisher,P.W., Brigham-Burke,M., Wu,S.J., Luo,J., Carton,J., Staquet,K., Gao,W., Jackson,S., Bethea,D., Chen,C., Hu,B., Giles-Komar,J., and Yang,J. (2005). A novel site contributing to growth-arrest-specific gene 6 binding to its receptors as revealed by a human monoclonal antibody. *Biochem. J.* 387, 727-735.
- Francis,P., Namlos,H.M., Muller,C., Eden,P., Fernebro,J., Berner,J.M., Bjerkehagen,B., Akerman,M., Bendahl,P.O., Isinger,A., Rydholm,A., Myklebost,O., and Nilbert,M. (2007). Diagnostic and prognostic gene expression signatures in 177 soft tissue sarcomas: hypoxia-induced transcription profile signifies metastatic potential. *BMC. Genomics* 8, 73.
- Fridell,Y.W., Villa,J., Jr., Attar,E.C., and Liu,E.T. (1998). GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 273, 7123-7126.
- Frisch,S.M., Vuori,K., Ruoslahti,E., and Chan-Hui,P.Y. (1996). Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J. Cell Biol.* 134, 793-799.

- Funakoshi,H., Yonemasu,T., Nakano,T., Matumoto,K., and Nakamura,T. (2002). Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* *68*, 150-160.
- Furthauer,M., Lin,W., Ang,S.L., Thisse,B., and Thisse,C. (2002). Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat. Cell Biol.* *4*, 170-174.
- Gal,A., Li,Y., Thompson,D.A., Weir,J., Orth,U., Jacobson,S.G., Apfelstedt-Sylla,E., and Vollrath,D. (2000). Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* *26*, 270-271.
- Galili,N., Davis,R.J., Fredericks,W.J., Mukhopadhyay,S., Rauscher,F.J., III, Emanuel,B.S., Rovera,G., and Barr,F.G. (1993). Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat. Genet.* *5*, 230-235.
- Garces,C.A., Kurenova,E.V., Golubovskaya,V.M., and Cance,W.G. (2006). Vascular endothelial growth factor receptor-3 and focal adhesion kinase bind and suppress apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res.* *66*, 1446-1454.
- Garton,A.J. and Tonks,N.K. (1999). Regulation of fibroblast motility by the protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *J. Biol. Chem.* *274*, 3811-3818.
- Gensler,M., Buschbeck,M., and Ullrich,A. (2004). Negative regulation of HER2 signaling by the PEST-type protein-tyrosine phosphatase BDP1. *J. Biol. Chem.* *279*, 12110-12116.
- Georgescu,M.M., Kirsch,K.H., Shishido,T., Zong,C., and Hanafusa,H. (1999). Biological effects of c-Mer receptor tyrosine kinase in hematopoietic cells depend on the Grb2 binding site in the receptor and activation of NF-kappaB. *Mol. Cell Biol.* *19*, 1171-1181.
- Ghiglione,C., Carraway,K.L., III, Amundadottir,L.T., Boswell,R.E., Perrimon,N., and Duffy,J.B. (1999). The transmembrane molecule kekkon 1 acts in a feedback loop to negatively regulate the activity of the Drosophila EGF receptor during oogenesis. *Cell* *96*, 847-856.
- Gillett,C., Fantl,V., Smith,R., Fisher,C., Bartek,J., Dickson,C., Barnes,D., and Peters,G. (1994). Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res.* *54*, 1812-1817.
- Ginsberg,J.P., Davis,R.J., Bennicelli,J.L., Nauta,L.E., and Barr,F.G. (1998). Up-regulation of MET but not neural cell adhesion molecule expression by the PAX3-FKHR fusion protein in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* *58*, 3542-3546.
- Godowski,P.J., Mark,M.R., Chen,J., Sadick,M.D., Raab,H., and Hammonds,R.G. (1995). Reevaluation of the roles of protein S and Gas6 as ligands for the receptor tyrosine kinase Rse/Tyro 3. *Cell* *82*, 355-358.
- Golembo,M., Schweitzer,R., Freeman,M., and Shilo,B.Z. (1996). Argos transcription is induced by the Drosophila EGF receptor pathway to form an inhibitory feedback loop. *Development* *122*, 223-230.

- Goruppi,S., Chiaruttini,C., Ruaro,M.E., Varnum,B., and Schneider,C. (2001). Gas6 induces growth, beta-catenin stabilization, and T-cell factor transcriptional activation in contact-inhibited C57 mammary cells. *Mol. Cell Biol.* *21*, 902-915.
- Goruppi,S., Ruaro,E., and Schneider,C. (1996). Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* *12*, 471-480.
- Goruppi,S., Ruaro,E., Varnum,B., and Schneider,C. (1997). Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway and Src for Gas6-Axl mitogenic and survival activities in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* *17*, 4442-4453.
- Gozuacik,D., Bialik,S., Raveh,T., Mitou,G., Shohat,G., Sabanay,H., Mizushima,N., Yoshimori,T., and Kimchi,A. (2008). DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell Death. Differ.* *15*, 1875-1886.
- Graham,D.K., Bowman,G.W., Dawson,T.L., Stanford,W.L., Earp,H.S., and Snodgrass,H.R. (1995). Cloning and developmental expression analysis of the murine c-mer tyrosine kinase. *Oncogene* *10*, 2349-2359.
- Graham,D.K., Dawson,T.L., Mullaney,D.L., Snodgrass,H.R., and Earp,H.S. (1994). Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth Differ.* *5*, 647-657.
- Greco,A., Roccato,E., Miranda,C., Cleris,L., Formelli,F., and Pierotti,M.A. (2001). Growth-inhibitory effect of STI571 on cells transformed by the COL1A1/PDGFB rearrangement. *Int. J. Cancer* *92*, 354-360.
- Gross,I., Bassit,B., Benezra,M., and Licht,J.D. (2001). Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. *J. Biol. Chem.* *276*, 46460-46468.
- Guillou,L. and Coindre,J.M. (1997). [Prognostic factors in soft tissue sarcoma in the adult]. *Ann. Pathol.* *17*, 375-377.
- Gur,G., Rubin,C., Katz,M., Amit,I., Citri,A., Nilsson,J., Amariglio,N., Henriksson,R., Rechavi,G., Hedman,H., Wides,R., and Yarden,Y. (2004). LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation. *EMBO J.* *23*, 3270-3281.
- Guttridge,K.L., Luft,J.C., Dawson,T.L., Kozlowska,E., Mahajan,N.P., Varnum,B., and Earp,H.S. (2002). Mer receptor tyrosine kinase signaling: prevention of apoptosis and alteration of cytoskeletal architecture without stimulation or proliferation. *J. Biol. Chem.* *277*, 24057-24066.
- Guvakova,M.A. and Surmacz,E. (1999). The activated insulin-like growth factor I receptor induces depolarization in breast epithelial cells characterized by actin filament disassembly and tyrosine dephosphorylation of FAK, Cas, and paxillin. *Exp. Cell Res.* *251*, 244-255.
- Gyorffy,B. and Lage,H. (2007). A Web-based data warehouse on gene expression in human malignant melanoma. *J. Invest Dermatol.* *127*, 394-399.

- Hackel,P.O., Gishizky,M., and Ullrich,A. (2001). Mig-6 is a negative regulator of the epidermal growth factor receptor signal. *Biol. Chem.* 382, 1649-1662.
- Hafizi,S. and Dahlback,B. (2006). Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17, 295-304.
- Haglund,K., Di Fiore,P.P., and Dikic,I. (2003a). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem. Sci.* 28, 598-603.
- Haglund,K., Sigismund,S., Polo,S., Szymkiewicz,I., Di Fiore,P.P., and Dikic,I. (2003b). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat. Cell Biol.* 5, 461-466.
- Haj,F.G., Markova,B., Klamann,L.D., Bohmer,F.D., and Neel,B.G. (2003). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *J. Biol. Chem.* 278, 739-744.
- Hall,M.O., Prieto,A.L., Obin,M.S., Abrams,T.A., Burgess,B.L., Heeb,M.J., and Agnew,B.J. (2001). Outer segment phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells requires Gas6. *Exp. Eye Res.* 73, 509-520.
- Hamosh,A., Scott,A.F., Amberger,J., Valle,D., and McKusick,V.A. (2000). Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). *Hum. Mutat.* 15, 57-61.
- Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanks,S.K. and Polte,T.R. (1997). Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays* 19, 137-145.
- Harvey,K.F. and Kumar,S. (1999). Nedd4-like proteins: an emerging family of ubiquitin-protein ligases implicated in diverse cellular functions. *Trends Cell Biol.* 9, 166-169.
- Hashimoto,H., Daimaru,Y., Tsuneyoshi,M., and Enjoji,M. (1986). Leiomyosarcoma of the external soft tissues. A clinicopathologic, immunohistochemical, and electron microscopic study. *Cancer* 57, 2077-2088.
- Hashimoto,H., Tsuneyoshi,M., and Enjoji,M. (1985). Malignant smooth muscle tumors of the retroperitoneum and mesentery: a clinicopathologic analysis of 44 cases. *J. Surg. Oncol.* 28, 177-186.
- Hassid,A., Huang,S., and Yao,J. (1999). Role of PTP-1B in aortic smooth muscle cell motility and tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins. *Am. J. Physiol* 277, H192-H198.
- Hecht,M., Schulte,J.H., Eggert,A., Wilting,J., and Schweigerer,L. (2005). The neurotrophin receptor TrkB cooperates with c-Met in enhancing neuroblastoma invasiveness. *Carcinogenesis* 26, 2105-2115.
- Heimann,P., Devalck,C., Debusscher,C., Sariban,E., and Vamos,E. (1998). Alveolar soft-part sarcoma: further evidence by FISH for the involvement of chromosome band 17q25. *Genes Chromosomes. Cancer* 23, 194-197.

- Heinrich, M.C., Corless, C.L., Demetri, G.D., Blanke, C.D., von Mehren, M., Joensuu, H., McGreevey, L.S., Chen, C.J., Van den Abbeele, A.D., Druker, B.J., Kiese, B., Eisenberg, B., Roberts, P.J., Singer, S., Fletcher, C.D., Silberman, S., Dimitrijevic, S., and Fletcher, J.A. (2003a). Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J. Clin. Oncol.* *21*, 4342-4349.
- Heinrich, M.C., Corless, C.L., Duensing, A., McGreevey, L., Chen, C.J., Joseph, N., Singer, S., Griffith, D.J., Haley, A., Town, A., Demetri, G.D., Fletcher, C.D., and Fletcher, J.A. (2003b). PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* *299*, 708-710.
- Heinrich, M.C., McArthur, G.A., Demetri, G.D., Joensuu, H., Bono, P., Herrmann, R., Hirte, H., Cresta, S., Koslin, D.B., Corless, C.L., Dirnhofer, S., van Oosterom, A.T., Nikolova, Z., Dimitrijevic, S., and Fletcher, J.A. (2006). Clinical and molecular studies of the effect of imatinib on advanced aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *J. Clin. Oncol.* *24*, 1195-1203.
- Heldin, C.H., Ostman, A., and Ronnstrand, L. (1998). Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim. Biophys. Acta* *1378*, F79-113.
- Helman, L.J. and Meltzer, P. (2003). Mechanisms of sarcoma development. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 685-694.
- Henriksen, J., Aagesen, T.H., Maelandsmo, G.M., Lothe, R.A., Myklebost, O., and Forus, A. (2003). Amplification and overexpression of COPS3 in osteosarcomas potentially target TP53 for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* *22*, 5358-5361.
- Hermine, O., Mayeux, P., Titeux, M., Mitjavila, M.T., Casadevall, N., Guichard, J., Komatsu, N., Suda, T., Miura, Y., Vainchenker, W., and . (1992). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and erythropoietin act competitively to induce two different programs of differentiation in the human pluripotent cell line UT-7. *Blood* *80*, 3060-3069.
- Hernando, E., Charytonowicz, E., Dudas, M.E., Menendez, S., Matushansky, I., Mills, J., Socci, N.D., Behrendt, N., Ma, L., Maki, R.G., Pandolfi, P.P., and Cordon-Cardo, C. (2007). The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas. *Nat. Med.* *13*, 748-753.
- Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., Muhammad, T.G., Matsuzawa, Y., Kanakura, Y., Shinomura, Y., and Kitamura, Y. (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* *279*, 577-580.
- Holland, S.J., Powell, M.J., Franci, C., Chan, E.W., Frieri, A.M., Atchison, R.E., McLaughlin, J., Swift, S.E., Pali, E.S., Yam, G., Wong, S., Lasaga, J., Shen, M.R., Yu, S., Xu, W., Hitoshi, Y., Bogenberger, J., Nor, J.E., Payan, D.G., and Lorens, J.B. (2005). Multiple roles for the receptor tyrosine kinase axl in tumor formation. *Cancer Res.* *65*, 9294-9303.
- Hu, B., Jennings, J.H., Sonstein, J., Floros, J., Todt, J.C., Polak, T., and Curtis, J.L. (2004). Resident murine alveolar and peritoneal macrophages differ in adhesion of apoptotic thymocytes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *30*, 687-693.
- Hubbard, S.R. (2004). Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 464-471.



- Hunter,T. (1997). Oncoprotein networks. *Cell* 88, 333-346.
- Hutterer,M., Knyazev,P., Abate,A., Reschke,M., Maier,H., Stefanova,N., Knyazeva,T., Barbieri,V., Reindl,M., Muigg,A., Kostron,H., Stockhammer,G., and Ullrich,A. (2008). Axl and growth arrest-specific gene 6 are frequently overexpressed in human gliomas and predict poor prognosis in patients with glioblastoma multiforme. *Clin. Cancer Res.* 14, 130-138.
- Hyun,T.S. and Ross,T.S. (2004). HIP1: trafficking roles and regulation of tumorigenesis. *Trends Mol. Med.* 10, 194-199.
- Impagnatiello,M.A., Weitzer,S., Gannon,G., Compagni,A., Cotten,M., and Christofori,G. (2001). Mammalian sprouty-1 and -2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signaling in endothelial cells. *J. Cell Biol.* 152, 1087-1098.
- Ishimoto,Y., Ohashi,K., Mizuno,K., and Nakano,T. (2000). Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *J. Biochem.* 127, 411-417.
- Italiano,A., Cardot,N., Dupre,F., Monticelli,I., Keslair,F., Piche,M., Mainguene,C., Coindre,J.M., and Pedeutour,F. (2007). Gains and complex rearrangements of the 12q13-15 chromosomal region in ordinary lipomas: the "missing link" between lipomas and liposarcomas? *Int. J. Cancer* 121, 308-315.
- Ito,M., Nakashima,M., Nakayama,T., Ohtsuru,A., Nagayama,Y., Takamura,N., Demedchik,E.P., Sekine,I., and Yamashita,S. (2002). Expression of receptor-type tyrosine kinase, Axl, and its ligand, Gas6, in pediatric thyroid carcinomas around chernobyl. *Thyroid* 12, 971-975.
- Ito,T., Ito,M., Naito,S., Ohtsuru,A., Nagayama,Y., Kanematsu,T., Yamashita,S., and Sekine,I. (1999). Expression of the Axl receptor tyrosine kinase in human thyroid carcinoma. *Thyroid* 9, 563-567.
- Jacob,A.N., Kalapurakal,J., Davidson,W.R., Kandpal,G., Dunson,N., Prashar,Y., and Kandpal,R.P. (1999). A receptor tyrosine kinase, UFO/Axl, and other genes isolated by a modified differential display PCR are overexpressed in metastatic prostatic carcinoma cell line DU145. *Cancer Detect. Prev.* 23, 325-332.
- Janinis,J., Patriki,M., Vini,L., Aravantinos,G., and Whelan,J.S. (2003). The pharmacological treatment of aggressive fibromatosis: a systematic review. *Ann. Oncol.* 14, 181-190.
- Jankowski,K., Kucia,M., Wysoczynski,M., Reza,R., Zhao,D., Trzyna,E., Trent,J., Peiper,S., Zembala,M., Ratajczak,J., Houghton,P., Janowska-Wieczorek,A., and Ratajczak,M.Z. (2003). Both hepatocyte growth factor (HGF) and stromal-derived factor-1 regulate the metastatic behavior of human rhabdomyosarcoma cells, but only HGF enhances their resistance to radiochemotherapy. *Cancer Res.* 63, 7926-7935.
- Jiang,X. and Sorkin,A. (2003). Epidermal growth factor receptor internalization through clathrin-coated pits requires Cbl RING finger and proline-rich domains but not receptor polyubiquitylation. *Traffic.* 4, 529-543.

Jilong, Y., Jian, W., Xiaoyan, Z., Xiaoqiu, L., and Xiongzeng, Z. (2007). Analysis of APC/beta-catenin genes mutations and Wnt signalling pathway in desmoid-type fibromatosis. *Pathology* 39, 319-325.

Jin, M.H., Sawamoto, K., Ito, M., and Okano, H. (2000). The interaction between the Drosophila secreted protein argos and the epidermal growth factor receptor inhibits dimerization of the receptor and binding of secreted spitz to the receptor. *Mol. Cell Biol.* 20, 2098-2107.

Joensuu, H., Roberts, P.J., Sarlomo-Rikala, M., Andersson, L.C., Tervahartiala, P., Tuveson, D., Silberman, S., Capdeville, R., Dimitrijevic, S., Druker, B., and Demetri, G.D. (2001). Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N. Engl. J. Med.* 344, 1052-1056.

Kamb, A., Gruis, N.A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavitgian, S.V., Stockert, E., Day, R.S., III, Johnson, B.E., and Skolnick, M.H. (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264, 436-440.

Kang, G.H., Kim, K.M., Park, C.K., and Kang, D.Y. (2009). PKC-theta expression in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumour and malignant peripheral nerve sheath tumour. *Histopathology* 55, 368-369.

Karpeh, M.S., Brennan, M.F., Cance, W.G., Woodruff, J.M., Pollack, D., Casper, E.S., Dudas, M.E., Latres, E., Drobnjak, M., and Cordon-Cardo, C. (1995). Altered patterns of retinoblastoma gene product expression in adult soft-tissue sarcomas. *Br. J. Cancer* 72, 986-991.

Katagiri, M., Hakeda, Y., Chikazu, D., Ogasawara, T., Takato, T., Kumegawa, M., Nakamura, K., and Kawaguchi, H. (2001). Mechanism of stimulation of osteoclastic bone resorption through Gas6/Tyro 3, a receptor tyrosine kinase signaling, in mouse osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 276, 7376-7382.

Kawaguchi, K., Oda, Y., Saito, T., Takahira, T., Yamamoto, H., Tamiya, S., Iwamoto, Y., and Tsuneyoshi, M. (2005). Genetic and epigenetic alterations of the PTEN gene in soft tissue sarcomas. *Hum. Pathol.* 36, 357-363.

Kawaguchi, K., Oda, Y., Saito, T., Yamamoto, H., Takahira, T., Tamiya, S., Iwamoto, Y., and Tsuneyoshi, M. (2004). Death-associated protein kinase (DAP kinase) alteration in soft tissue leiomyosarcoma: Promoter methylation or homozygous deletion is associated with a loss of DAP kinase expression. *Hum. Pathol.* 35, 1266-1271.

Kawaguchi, K., Oda, Y., Saito, T., Yamamoto, H., Tamiya, S., Takahira, T., Miyajima, K., Iwamoto, Y., and Tsuneyoshi, M. (2003). Mechanisms of inactivation of the p16INK4a gene in leiomyosarcoma of soft tissue: decreased p16 expression correlates with promoter methylation and poor prognosis. *J. Pathol.* 201, 487-495.

Keleti, J., Quezado, M.M., Abaza, M.M., Raffeld, M., and Tsokos, M. (1996). The MDM2 oncoprotein is overexpressed in rhabdomyosarcoma cell lines and stabilizes wild-type p53 protein. *Am. J. Pathol.* 149, 143-151.

Khan, J., Bittner, M.L., Saal, L.H., Teichmann, U., Azorsa, D.O., Gooden, G.C., Pavan, W.J., Trent, J.M., and Meltzer, P.S. (1999). cDNA microarrays detect activation of a myogenic

transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 13264-13269.

Kindblom, L.G., Remotti, H.E., Aldenborg, F., and Meis-Kindblom, J.M. (1998). Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am. J. Pathol.* *152*, 1259-1269.

Klein, D.E., Nappi, V.M., Reeves, G.T., Shvartsman, S.Y., and Lemmon, M.A. (2004). Argos inhibits epidermal growth factor receptor signalling by ligand sequestration. *Nature* *430*, 1040-1044.

Knezevich, S.R., McFadden, D.E., Tao, W., Lim, J.F., and Sorensen, P.H. (1998). A novel ETV6-NTRK3 gene fusion in congenital fibrosarcoma. *Nat. Genet.* *18*, 184-187.

Korf, B.R. (2001). Diagnosis and management of neurofibromatosis type 1. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *1*, 162-167.

Korshunov, V.A., Mohan, A.M., Georger, M.A., and Berk, B.C. (2006). Axl, a receptor tyrosine kinase, mediates flow-induced vascular remodeling. *Circ. Res.* *98*, 1446-1452.

Kotecha, S.A., Oak, J.N., Jackson, M.F., Perez, Y., Orser, B.A., Van Tol, H.H., and MacDonald, J.F. (2002). A D2 class dopamine receptor transactivates a receptor tyrosine kinase to inhibit NMDA receptor transmission. *Neuron* *35*, 1111-1122.

Kovalenko, D., Yang, X., Nadeau, R.J., Harkins, L.K., and Friesel, R. (2003). Sef inhibits fibroblast growth factor signaling by inhibiting FGFR1 tyrosine phosphorylation and subsequent ERK activation. *J. Biol. Chem.* *278*, 14087-14091.

Kovalenko, M., Denner, K., Sandstrom, J., Persson, C., Gross, S., Jandt, E., Vilella, R., Bohmer, F., and Ostman, A. (2000). Site-selective dephosphorylation of the platelet-derived growth factor beta-receptor by the receptor-like protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *J. Biol. Chem.* *275*, 16219-16226.

Kramer, S., Okabe, M., Hacoheh, N., Krasnow, M.A., and Hiromi, Y. (1999). Sprouty: a common antagonist of FGF and EGF signaling pathways in *Drosophila*. *Development* *126*, 2515-2525.

Kume, A., Nishiura, H., Suda, J., and Suda, T. (1997). Focal adhesion kinase upregulated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor but not by interleukin-3 in differentiating myeloid cells. *Blood* *89*, 3434-3442.

Laederich, M.B., Funes-Duran, M., Yen, L., Ingalla, E., Wu, X., Carraway, K.L., III, and Sweeney, C. (2004). The leucine-rich repeat protein LRIG1 is a negative regulator of ErbB family receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* *279*, 47050-47056.

Lai, C., Gore, M., and Lemke, G. (1994). Structure, expression, and activity of Tyro 3, a neural adhesion-related receptor tyrosine kinase. *Oncogene* *9*, 2567-2578.

Lai, C. and Lemke, G. (1991). An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron* *6*, 691-704.

- Lammers,R., Bossenmaier,B., Cool,D.E., Tonks,N.K., Schlessinger,J., Fischer,E.H., and Ullrich,A. (1993). Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells. *J. Biol. Chem.* *268*, 22456-22462.
- Lamorte,L. and Park,M. (2001). The receptor tyrosine kinases: role in cancer progression. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* *10*, 271-88, viii.
- Lan,Z., Wu,H., Li,W., Wu,S., Lu,L., Xu,M., and Dai,W. (2000). Transforming activity of receptor tyrosine kinase tyro3 is mediated, at least in part, by the PI3 kinase-signaling pathway. *Blood* *95*, 633-638.
- Lanari,A. (1983). Effect of progesterone on desmoid tumors (aggressive fibromatosis). *N. Engl. J. Med.* *309*, 1523.
- Lannon,C.L. and Sorensen,P.H. (2005). ETV6-NTRK3: a chimeric protein tyrosine kinase with transformation activity in multiple cell lineages. *Semin. Cancer Biol.* *15*, 215-223.
- Lee,Y.F., John,M., Edwards,S., Clark,J., Flohr,P., Maillard,K., Edema,M., Baker,L., Mangham,D.C., Grimer,R., Wooster,R., Thomas,J.M., Fisher,C., Judson,I., and Cooper,C.S. (2003). Molecular classification of synovial sarcomas, leiomyosarcomas and malignant fibrous histiocytomas by gene expression profiling. *Br. J. Cancer* *88*, 510-515.
- Lemke,G. and Lu,Q. (2003). Macrophage regulation by Tyro 3 family receptors. *Curr. Opin. Immunol.* *15*, 31-36.
- Leu,H.J. and Makek,M. (1986). Intramural venous leiomyosarcomas. *Cancer* *57*, 1395-1400.
- Levy,B., Mukherjee,T., and Hirschhorn,K. (2000). Molecular cytogenetic analysis of uterine leiomyoma and leiomyosarcoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* *121*, 1-8.
- Levy,Y., Tsapis,A., and Brouet,J.C. (1991). Interleukin-6 antisense oligonucleotides inhibit the growth of human myeloma cell lines. *J. Clin. Invest* *88*, 696-699.
- Lewis,P.M., Crosier,K.E., Wood,C.R., and Crosier,P.S. (1996). Analysis of the murine Dtk gene identifies conservation of genomic structure within a new receptor tyrosine kinase subfamily. *Genomics* *31*, 13-19.
- Li,R., Chen,J., Hammonds,G., Phillips,H., Armanini,M., Wood,P., Bunge,R., Godowski,P.J., Sliwkowski,M.X., and Mather,J.P. (1996). Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells. *J. Neurosci.* *16*, 2012-2019.
- Li,Y., Gerbod-Giannone,M.C., Seitz,H., Cui,D., Thorp,E., Tall,A.R., Matsushima,G.K., and Tabas,I. (2006). Cholesterol-induced apoptotic macrophages elicit an inflammatory response in phagocytes, which is partially attenuated by the Mer receptor. *J. Biol. Chem.* *281*, 6707-6717.
- Libura,J., Drukala,J., Majka,M., Tomescu,O., Navenot,J.M., Kucia,M., Marquez,L., Peiper,S.C., Barr,F.G., Janowska-Wieczorek,A., and Ratajczak,M.Z. (2002). CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood* *100*, 2597-2606.

- Lin, W.C., Li, A.F., Chi, C.W., Chung, W.W., Huang, C.L., Lui, W.Y., Kung, H.J., and Wu, C.W. (1999). tie-1 protein tyrosine kinase: a novel independent prognostic marker for gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* *5*, 1745-1751.
- Ling, L. and Kung, H.J. (1995). Mitogenic signals and transforming potential of Nyk, a newly identified neural cell adhesion molecule-related receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell Biol.* *15*, 6582-6592.
- Liu, E., Hjelle, B., and Bishop, J.M. (1988). Transforming genes in chronic myelogenous leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *85*, 1952-1956.
- Liu, W., Bloom, D.A., Cance, W.G., Kurenova, E.V., Golubovskaya, V.M., and Hochwald, S.N. (2008). FAK and IGF-IR interact to provide survival signals in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* *29*, 1096-1107.
- Lo, K.Y., Chin, W.H., Ng, Y.P., Cheng, A.W., Cheung, Z.H., and Ip, N.Y. (2005). SLAM-associated protein as a potential negative regulator in Trk signaling. *J. Biol. Chem.* *280*, 41744-41752.
- Loeser, R.F., Varnum, B.C., Carlson, C.S., Goldring, M.B., Liu, E.T., Sadiev, S., Kute, T.E., and Wallin, R. (1997). Human chondrocyte expression of growth-arrest-specific gene 6 and the tyrosine kinase receptor axl: potential role in autocrine signaling in cartilage. *Arthritis Rheum.* *40*, 1455-1465.
- Lu, Q., Gore, M., Zhang, Q., Camenisch, T., Boast, S., Casagrande, F., Lai, C., Skinner, M.K., Klein, R., Matsushima, G.K., Earp, H.S., Goff, S.P., and Lemke, G. (1999). Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature* *398*, 723-728.
- Lu, Q. and Lemke, G. (2001). Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science* *293*, 306-311.
- Lu, Z., Jiang, G., Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Mol. Cell Biol.* *21*, 4016-4031.
- Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D.J., Bartkova, J., Strauss, M., Peters, G., and Bartek, J. (1995). Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* *375*, 503-506.
- Luttun, A. and Carmeliet, P. (2001). Genetic studies on the role of proteinases and growth factors in atherosclerosis and aneurysm formation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *947*, 124-132.
- Lux, M.L., Rubin, B.P., Biase, T.L., Chen, C.J., Maclure, T., Demetri, G., Xiao, S., Singer, S., Fletcher, C.D., and Fletcher, J.A. (2000). KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am. J. Pathol.* *156*, 791-795.
- Macleod, K., Mullen, P., Sewell, J., Rabiasz, G., Lawrie, S., Miller, E., Smyth, J.F., and Langdon, S.P. (2005). Altered ErbB receptor signaling and gene expression in cisplatin-resistant ovarian cancer. *Cancer Res.* *65*, 6789-6800.

- Mahajan,N.P., Whang,Y.E., Mohler,J.L., and Earp,H.S. (2005). Activated tyrosine kinase Ack1 promotes prostate tumorigenesis: role of Ack1 in polyubiquitination of tumor suppressor Wwox. *Cancer Res.* *65*, 10514-10523.
- Maher,P.A. (1993). Activation of phosphotyrosine phosphatase activity by reduction of cell-substrate adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 11177-11181.
- Maki,R.G., Awan,R.A., Dixon,R.H., Jhanwar,S., and Antonescu,C.R. (2002). Differential sensitivity to imatinib of 2 patients with metastatic sarcoma arising from dermatofibrosarcoma protuberans. *Int. J. Cancer* *100*, 623-626.
- Man,S., Ellis,I.O., Sibbering,M., Blamey,R.W., and Brook,J.D. (1996). High levels of allele loss at the FHIT and ATM genes in non-comedo ductal carcinoma in situ and grade I tubular invasive breast cancers. *Cancer Res.* *56*, 5484-5489.
- Mancini,A., Koch,A., Wilms,R., and Tamura,T. (2002). c-Cbl associates directly with the C-terminal tail of the receptor for the macrophage colony-stimulating factor, c-Fms, and down-modulates this receptor but not the viral oncogene v-Fms. *J. Biol. Chem.* *277*, 14635-14640.
- Mandahl,N., Mertens,F., and Mitelman,F. (1999). Genetic changes in bone and soft tissue tumors. *Acta Orthop. Scand. Suppl* *285*, 30-40.
- Manes,S., Mira,E., Gomez-Mouton,C., Zhao,Z.J., Lacalle,R.A., and Martinez,A. (1999). Concerted activity of tyrosine phosphatase SHP-2 and focal adhesion kinase in regulation of cell motility. *Mol. Cell Biol.* *19*, 3125-3135.
- Manfioletti,G., Brancolini,C., Avanzi,G., and Schneider,C. (1993). The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol. Cell Biol.* *13*, 4976-4985.
- Mariani,O., Brennetot,C., Coindre,J.M., Gruel,N., Ganem,C., Delattre,O., Stern,M.H., and Aurias,A. (2007). JUN oncogene amplification and overexpression block adipocytic differentiation in highly aggressive sarcomas. *Cancer Cell* *11*, 361-374.
- Mariotti,A., Kedeshian,P.A., Dans,M., Curatola,A.M., Gagnoux-Palacios,L., and Giancotti,F.G. (2001). EGF-R signaling through Fyn kinase disrupts the function of integrin alpha6beta4 at hemidesmosomes: role in epithelial cell migration and carcinoma invasion. *J. Cell Biol.* *155*, 447-458.
- Mark,M.R., Chen,J., Hammonds,R.G., Sadick,M., and Godowsk,P.J. (1996). Characterization of Gas6, a member of the superfamily of G domain-containing proteins, as a ligand for Rse and Axl. *J. Biol. Chem.* *271*, 9785-9789.
- Mark,M.R., Scadden,D.T., Wang,Z., Gu,Q., Goddard,A., and Godowski,P.J. (1994). rse, a novel receptor-type tyrosine kinase with homology to Axl/Ufo, is expressed at high levels in the brain. *J. Biol. Chem.* *269*, 10720-10728.
- Marsh,H.N., Dubreuil,C.I., Quevedo,C., Lee,A., Majdan,M., Walsh,G.S., Hausdorff,S., Said,F.A., Zoueva,O., Kozlowski,M., Siminovitch,K., Neel,B.G., Miller,F.D., and Kaplan,D.R. (2003). SHP-1 negatively regulates neuronal survival by functioning as a TrkA phosphatase. *J. Cell Biol.* *163*, 999-1010.

- Martin,M.J., Melnyk,N., Pollard,M., Bowden,M., Leong,H., Podor,T.J., Gleave,M., and Sorensen,P.H. (2006). The insulin-like growth factor I receptor is required for Akt activation and suppression of anoikis in cells transformed by the ETV6-NTRK3 chimeric tyrosine kinase. *Mol. Cell Biol.* 26, 1754-1769.
- Matsubara,N., Takahashi,Y., Nishina,Y., Mukouyama,Y., Yanagisawa,M., Watanabe,T., Nakano,T., Nomura,K., Arita,H., Nishimune,Y., Obinata,M., and Matsui,Y. (1996). A receptor tyrosine kinase, Sky, and its ligand Gas 6 are expressed in gonads and support primordial germ cell growth or survival in culture. *Dev. Biol.* 180, 499-510.
- Matsushima,H. and Bogenmann,E. (1993). Expression of trkA cDNA in neuroblastomas mediates differentiation in vitro and in vivo. *Mol. Cell Biol.* 13, 7447-7456.
- Mc,C.O., Chung,W.Y., Fitzpatrick,P., Cooke,F., Flynn,B., Harrison,M., Fox,E., Gallagher,E., Goldrick,A.M., Dervan,P.A., Mc,C.A., and Kerin,M.J. (2008). Growth arrest-specific gene 6 expression in human breast cancer. *Br. J. Cancer* 98, 1141-1146.
- McArthur,G.A., Demetri,G.D., van Oosterom,A., Heinrich,M.C., Debiec-Rychter,M., Corless,C.L., Nikolova,Z., Dimitrijevic,S., and Fletcher,J.A. (2005). Molecular and clinical analysis of locally advanced dermatofibrosarcoma protuberans treated with imatinib: Imatinib Target Exploration Consortium Study B2225. *J. Clin. Oncol.* 23, 866-873.
- McCloskey,P., Fridell,Y.W., Attar,E., Villa,J., Jin,Y., Varnum,B., and Liu,E.T. (1997). GAS6 mediates adhesion of cells expressing the receptor tyrosine kinase Axl. *J. Biol. Chem.* 272, 23285-23291.
- McHenry,C.L., Liu,Y., Feng,W., Nair,A.R., Feathers,K.L., Ding,X., Gal,A., Vollrath,D., Sieving,P.A., and Thompson,D.A. (2004). MERTK arginine-844-cysteine in a patient with severe rod-cone dystrophy: loss of mutant protein function in transfected cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 1456-1463.
- McLean,G.W., Carragher,N.O., Avizienyte,E., Evans,J., Brunton,V.G., and Frame,M.C. (2005). The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat. Rev. Cancer* 5, 505-515.
- Meesters,E.W., Hansen,H., Spronk,H.M., Hamulyak,K., Rosing,J., Rowshani,A.T., ten Berge,I.J., and ten Cate,H. (2007). The inflammation and coagulation cross-talk in patients with systemic lupus erythematosus. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 18, 21-28.
- Melaragno,M.G., Cavet,M.E., Yan,C., Tai,L.K., Jin,Z.G., Haendeler,J., and Berk,B.C. (2004). Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle: role of Axl kinase and Akt. *J. Mol. Cell Cardiol.* 37, 881-887.
- Melaragno,M.G., Wuthrich,D.A., Poppa,V., Gill,D., Lindner,V., Berk,B.C., and Corson,M.A. (1998). Increased expression of Axl tyrosine kinase after vascular injury and regulation by G protein-coupled receptor agonists in rats. *Circ. Res.* 83, 697-704.
- Merchant,N.B., Lewis,J.J., Woodruff,J.M., Leung,D.H., and Brennan,M.F. (1999). Extremity and trunk desmoid tumors: a multifactorial analysis of outcome. *Cancer* 86, 2045-2052.
- Meric,F., Lee,W.P., Sahin,A., Zhang,H., Kung,H.J., and Hung,M.C. (2002). Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 8, 361-367.

- Miao,H., Burnett,E., Kinch,M., Simon,E., and Wang,B. (2000). Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 2, 62-69.
- Michiels,S., Koscielny,S., and Hill,C. (2005). Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. *Lancet* 365, 488-492.
- Ming,C.W., Murao,K., Imachi,H., Sato,M., Nakano,T., Kodama,T., Sasaguri,Y., Wong,N.C., Takahara,J., and Ishida,T. (2001). Phosphatidylinositol 3-OH kinase-Akt/protein kinase B pathway mediates Gas6 induction of scavenger receptor a in immortalized human vascular smooth muscle cell line. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1592-1597.
- Mitelman,F., Johansson,B., and Mertens,F. (2007). The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat. Rev. Cancer* 7, 233-245.
- Miyajima,K., Oda,Y., Oshiro,Y., Tamiya,S., Kinukawa,N., Masuda,K., and Tsuneyoshi,M. (2002). Clinicopathological prognostic factors in soft tissue leiomyosarcoma: a multivariate analysis. *Histopathology* 40, 353-359.
- Miyamoto,S., Teramoto,H., Gutkind,J.S., and Yamada,K.M. (1996). Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J. Cell Biol.* 135, 1633-1642.
- Moller,E., Mandahl,N., Mertens,F., and Panagopoulos,I. (2008). Molecular identification of COL6A3-CSF1 fusion transcripts in tenosynovial giant cell tumors. *Genes Chromosomes. Cancer* 47, 21-25.
- Morrison,K.B., Tognon,C.E., Garnett,M.J., Deal,C., and Sorensen,P.H. (2002). ETV6-NTRK3 transformation requires insulin-like growth factor 1 receptor signaling and is associated with constitutive IRS-1 tyrosine phosphorylation. *Oncogene* 21, 5684-5695.
- Murao,K., Imachi,H., Sayo,Y., Hosokawa,H., Sato,M., Ishida,T., Nakano,T., Kodama,T., Sasaguri,Y., and Takahara,J. (1999). A product of growth arrest-specific gene 6 modulates scavenger receptor expression in human vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 459, 363-366.
- Murray-Zmijewski,F., Slee,E.A., and Lu,X. (2008). A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 702-712.
- Musacchio,M. and Perrimon,N. (1996). The *Drosophila* kekkon genes: novel members of both the leucine-rich repeat and immunoglobulin superfamilies expressed in the CNS. *Dev. Biol.* 178, 63-76.
- Nagata,K., Ohashi,K., Nakano,T., Arita,H., Zong,C., Hanafusa,H., and Mizuno,K. (1996). Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 271, 30022-30027.
- Nagayama,S., Katagiri,T., Tsunoda,T., Hosaka,T., Nakashima,Y., Araki,N., Kusuzaki,K., Nakayama,T., Tsuboyama,T., Nakamura,T., Imamura,M., Nakamura,Y., and Toguchida,J. (2002). Genome-wide analysis of gene expression in synovial sarcomas using a cDNA microarray. *Cancer Res.* 62, 5859-5866.



- Nakano,T., Higashino,K., Kikuchi,N., Kishino,J., Nomura,K., Fujita,H., Ohara,O., and Arita,H. (1995). Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for Ca(2+)-mobilizing growth factors. *J. Biol. Chem.* *270*, 5702-5705.
- Nakano,T., Kawamoto,K., Higashino,K., and Arita,H. (1996). Prevention of growth arrest-induced cell death of vascular smooth muscle cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *FEBS Lett.* *387*, 78-80.
- Nakano,T., Tani,M., Ishibashi,Y., Kimura,K., Park,Y.B., Imaizumi,N., Tsuda,H., Aoyagi,K., Sasaki,H., Ohwada,S., and Yokota,J. (2003). Biological properties and gene expression associated with metastatic potential of human osteosarcoma. *Clin. Exp. Metastasis* *20*, 665-674.
- Nemoto,T., Ohashi,K., Akashi,T., Johnson,J.D., and Hirokawa,K. (1997). Overexpression of protein tyrosine kinases in human esophageal cancer. *Pathobiology* *65*, 195-203.
- Neubauer,A., Fiebeler,A., Graham,D.K., O'Bryan,J.P., Schmidt,C.A., Barckow,P., Serke,S., Siegert,W., Snodgrass,H.R., Huhn,D., and . (1994). Expression of axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood* *84*, 1931-1941.
- Nielsen,T.O., West,R.B., Linn,S.C., Alter,O., Knowling,M.A., O'Connell,J.X., Zhu,S., Fero,M., Sherlock,G., Pollack,J.R., Brown,P.O., Botstein,D., and van de,R.M. (2002). Molecular characterisation of soft tissue tumours: a gene expression study. *Lancet* *359*, 1301-1307.
- Nielsen-Preiss,S.M., Allen,M.P., Xu,M., Linseman,D.A., Pawlowski,J.E., Bouchard,R.J., Varnum,B.C., Heidenreich,K.A., and Wierman,M.E. (2007). Adhesion-related kinase induction of migration requires phosphatidylinositol-3-kinase and ras stimulation of rac activity in immortalized gonadotropin-releasing hormone neuronal cells. *Endocrinology* *148*, 2806-2814.
- Nuciforo,P.G., Pellegrini,C., Fasani,R., Maggioni,M., Coggi,G., Parafioriti,A., and Bosari,S. (2003). Molecular and immunohistochemical analysis of HER2/neu oncogene in synovial sarcoma. *Hum. Pathol.* *34*, 639-645.
- Nyberg,P., He,X., Hardig,Y., Dahlback,B., and Garcia,d.F. (1997). Stimulation of Sky tyrosine phosphorylation by bovine protein S--domains involved in the receptor-ligand interaction. *Eur. J. Biochem.* *246*, 147-154.
- O'Bryan,J.P., Frye,R.A., Cogswell,P.C., Neubauer,A., Kitch,B., Prokop,C., Espinosa,R., III, Le Beau,M.M., Earp,H.S., and Liu,E.T. (1991). axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell Biol.* *11*, 5016-5031.
- O'Donnell,K., Harkes,I.C., Dougherty,L., and Wicks,I.P. (1999). Expression of receptor tyrosine kinase Axl and its ligand Gas6 in rheumatoid arthritis: evidence for a novel endothelial cell survival pathway. *Am. J. Pathol.* *154*, 1171-1180.
- Ohashi,K., Nagata,K., Toshima,J., Nakano,T., Arita,H., Tsuda,H., Suzuki,K., and Mizuno,K. (1995). Stimulation of sky receptor tyrosine kinase by the product of growth arrest-specific gene 6. *J. Biol. Chem.* *270*, 22681-22684.

- Ostman,A., Hellberg,C., and Bohmer,F.D. (2006). Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 307-320.
- Otano-Joos,M., Mechttersheimer,G., Ohl,S., Wilgenbus,K.K., Scheurlen,W., Lehnert,T., Willeke,F., Otto,H.F., Lichter,P., and Joos,S. (2000). Detection of chromosomal imbalances in leiomyosarcoma by comparative genomic hybridization and interphase cytogenetics. *Cytogenet. Cell Genet.* 90, 86-92.
- Owens,L.V., Xu,L., Craven,R.J., Dent,G.A., Weiner,T.M., Kornberg,L., Liu,E.T., and Cance,W.G. (1995). Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res.* 55, 2752-2755.
- Pante,G., Thompson,J., Lamballe,F., Iwata,T., Ferby,I., Barr,F.A., Davies,A.M., Maina,F., and Klein,R. (2005). Mitogen-inducible gene 6 is an endogenous inhibitor of HGF/Met-induced cell migration and neurite growth. *J. Cell Biol.* 171, 337-348.
- Parsons,J.T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell Sci.* 116, 1409-1416.
- Pawson,T., Gish,G.D., and Nash,P. (2001). SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol.* 11, 504-511.
- Pedeutour,F., Simon,M.P., Minoletti,F., Sozzi,G., Pierotti,M.A., Hecht,F., and Turc-Carel,C. (1995). Ring 22 chromosomes in dermatofibrosarcoma protuberans are low-level amplifiers of chromosome 17 and 22 sequences. *Cancer Res.* 55, 2400-2403.
- Pelech,S. (2004). Tracking cell signaling protein expression and phosphorylation by innovative proteomic solutions. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5, 69-77.
- Peng,H., Yang,G.H., Bu,H., and Gou,L.X. (2003). [Specific loss of heterozygosity of chromosome 3p loci in soft tissue leiomyosarcoma]. *Zhonghua Bing. Li Xue. Za Zhi.* 32, 124-127.
- Perot,G., Derre,J., Coindre,J.M., Tirode,F., Lucchesi,C., Mariani,O., Gibault,L., Guillou,L., Terrier,P., and Aurias,A. (2009). Strong smooth muscle differentiation is dependent on myocardin gene amplification in most human retroperitoneal leiomyosarcomas. *Cancer Res.* 69, 2269-2278.
- Persson,C., Savenhed,C., Bourdeau,A., Tremblay,M.L., Markova,B., Bohmer,F.D., Haj,F.G., Neel,B.G., Elson,A., Heldin,C.H., Ronnstrand,L., Ostman,A., and Hellberg,C. (2004). Site-selective regulation of platelet-derived growth factor beta receptor tyrosine phosphorylation by T-cell protein tyrosine phosphatase. *Mol. Cell Biol.* 24, 2190-2201.
- Peschard,P. and Park,M. (2003). Escape from Cbl-mediated downregulation: a recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases. *Cancer Cell* 3, 519-523.
- Peterson,S. and Bogenmann,E. (2004). The RET and TRKA pathways collaborate to regulate neuroblastoma differentiation. *Oncogene* 23, 213-225.
- Phillips,S.R., A'Hern,R., and Thomas,J.M. (2004). Aggressive fibromatosis of the abdominal wall, limbs and limb girdles. *Br. J. Surg.* 91, 1624-1629.

- Pipes,G.C., Creemers,E.E., and Olson,E.N. (2006). The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev.* *20*, 1545-1556.
- Pisters,P.W., Harrison,L.B., Leung,D.H., Woodruff,J.M., Casper,E.S., and Brennan,M.F. (1996). Long-term results of a prospective randomized trial of adjuvant brachytherapy in soft tissue sarcoma. *J. Clin. Oncol.* *14*, 859-868.
- Polsky,D., Mastorides,S., Kim,D., Dudas,M., Leon,L., Leung,D., Woodruff,J.M., Brennan,M.F., Osman,I., and Cordon-Cardo,C. (2006). Altered patterns of RB expression define groups of soft tissue sarcoma patients with distinct biological and clinical behavior. *Histol. Histopathol.* *21*, 743-752.
- Posner,M.C., Shiu,M.H., Newsome,J.L., Hajdu,S.I., Gaynor,J.J., and Brennan,M.F. (1989). The desmoid tumor. Not a benign disease. *Arch. Surg.* *124*, 191-196.
- Prasad,D., Rothlin,C.V., Burrola,P., Burstyn-Cohen,T., Lu,Q., Garcia,d.F., and Lemke,G. (2006). TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol. Cell Neurosci.* *33*, 96-108.
- Prieto,A.L., Weber,J.L., Tracy,S., Heeb,M.J., and Lai,C. (1999). Gas6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro-3, is widely expressed in the central nervous system. *Brain Res.* *816*, 646-661.
- Prieur,A., Tirode,F., Cohen,P., and Delattre,O. (2004). EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol. Cell Biol.* *24*, 7275-7283.
- Qian,X., Karpova,T., Sheppard,A.M., McNally,J., and Lowy,D.R. (2004). E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* *23*, 1739-1748.
- Quong,R.Y., Bickford,S.T., Ing,Y.L., Terman,B., Herlyn,M., and Lassam,N.J. (1994). Protein kinases in normal and transformed melanocytes. *Melanoma Res.* *4*, 313-319.
- Ragazzini,P., Gamberi,G., Pazzaglia,L., Serra,M., Magagnoli,G., Ponticelli,F., Ferrari,C., Ghinelli,C., Alberghini,M., Bertoni,F., Picci,P., and Benassi,M.S. (2004). Amplification of CDK4, MDM2, SAS and GLI genes in leiomyosarcoma, alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Histol. Histopathol.* *19*, 401-411.
- Rajani,B., Smith,T.A., Reith,J.D., and Goldblum,J.R. (1999). Retroperitoneal leiomyosarcomas unassociated with the gastrointestinal tract: a clinicopathologic analysis of 17 cases. *Mod. Pathol.* *12*, 21-28.
- Ranchod,M. and Kempson,R.L. (1977). Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract and retroperitoneum: a pathologic analysis of 100 cases. *Cancer* *39*, 255-262.
- Ray-Coquard,I., Le Cesne,A., Whelan,J.S., Schoffski,P., Bui,B.N., Verweij,J., Marreaud,S., van Glabbeke,M., Hogendoorn,P., and Blay,J.Y. (2008). A phase II study of gefitinib for patients with advanced HER-1 expressing synovial sarcoma refractory to doxorubicin-containing regimens. *Oncologist.* *13*, 467-473.

- Reich,A., Sapir,A., and Shilo,B. (1999). Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling. *Development* *126*, 4139-4147.
- Ren,B., Yu,Y.P., Jing,L., Liu,L., Michalopoulos,G.K., Luo,J.H., and Rao,U.N. (2003). Gene expression analysis of human soft tissue leiomyosarcomas. *Hum. Pathol.* *34*, 549-558.
- Rescigno,J., Mansukhani,A., and Basilico,C. (1991). A putative receptor tyrosine kinase with unique structural topology. *Oncogene* *6*, 1909-1913.
- Reyzer,M.L., Caldwell,R.L., Dugger,T.C., Forbes,J.T., Ritter,C.A., Guix,M., Arteaga,C.L., and Caprioli,R.M. (2004). Early changes in protein expression detected by mass spectrometry predict tumor response to molecular therapeutics. *Cancer Res.* *64*, 9093-9100.
- Richer,J.K., Jacobsen,B.M., Manning,N.G., Abel,M.G., Wolf,D.M., and Horwitz,K.B. (2002). Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* *277*, 5209-5218.
- Riva,P., Dalpra,L., Gualandri,V., Volonte,M., Miozzo,M., Malgara,R., Conti,A.F., and Larizza,L. (2000). 19p deletion in recurring leiomyosarcoma lesions from the same patient. *Cancer Genet. Cytogenet.* *119*, 102-108.
- Robinson,D.R., Wu,Y.M., and Lin,S.F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* *19*, 5548-5557.
- Rochlitz,C., Lohri,A., Bacchi,M., Schmidt,M., Nagel,S., Fopp,M., Fey,M.F., Herrmann,R., and Neubauer,A. (1999). Axl expression is associated with adverse prognosis and with expression of Bcl-2 and CD34 in de novo acute myeloid leukemia (AML): results from a multicenter trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Leukemia* *13*, 1352-1358.
- Rodrigues,G.A. and Park,M. (1994). Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *4*, 15-24.
- Rothlin,C.V., Ghosh,S., Zuniga,E.I., Oldstone,M.B., and Lemke,G. (2007). TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* *131*, 1124-1136.
- Rousseau-Merck,M.F., Fiette,L., Klochendler-Yeivin,A., Delattre,O., and Aurias,A. (2005). Chromosome mechanisms and INI1 inactivation in human and mouse rhabdoid tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* *157*, 127-133.
- Rubin,B.P., Schuetze,S.M., Eary,J.F., Norwood,T.H., Mirza,S., Conrad,E.U., and Bruckner,J.D. (2002). Molecular targeting of platelet-derived growth factor B by imatinib mesylate in a patient with metastatic dermatofibrosarcoma protuberans. *J. Clin. Oncol.* *20*, 3586-3591.
- Rubin,B.P., Singer,S., Tsao,C., Duensing,A., Lux,M.L., Ruiz,R., Hibbard,M.K., Chen,C.J., Xiao,S., Tuveson,D.A., Demetri,G.D., Fletcher,C.D., and Fletcher,J.A. (2001). KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* *61*, 8118-8121.
- Rubin,C., Litvak,V., Medvedovsky,H., Zwang,Y., Lev,S., and Yarden,Y. (2003). Sprouty fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops. *Curr. Biol.* *13*, 297-307.

- Russell, W.O., Cohen, J., Enzinger, F., Hajdu, S.I., Heise, H., Martin, R.G., Meissner, W., Miller, W.T., Schmitz, R.L., and Suit, H.D. (1977). A clinical and pathological staging system for soft tissue sarcomas. *Cancer* 40, 1562-1570.
- Saccone, S., Marcandalli, P., Gostissa, M., Schneider, C., and Della, V.G. (1995). Assignment of the human GAS6 gene to chromosome 13q34 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 30, 129-131.
- Sainaghi, P.P., Castello, L., Bergamasco, L., Galletti, M., Bellosta, P., and Avanzi, G.C. (2005). Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J. Cell Physiol* 204, 36-44.
- Sasaki, A., Taketomi, T., Kato, R., Saeki, K., Nonami, A., Sasaki, M., Kuriyama, M., Saito, N., Shibuya, M., and Yoshimura, A. (2003). Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nat. Cell Biol.* 5, 427-432.
- Sather, S., Kenyon, K.D., Lefkowitz, J.B., Liang, X., Varnum, B.C., Henson, P.M., and Graham, D.K. (2007). A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation. *Blood* 109, 1026-1033.
- Saunders, A.L., Meloni, A.M., Chen, Z., Sandberg, A.A., and Lauwers, G.Y. (1996). Two cases of low-grade gastric leiomyosarcoma with monosomy 14 as the only change. *Cancer Genet. Cytogenet.* 90, 184-185.
- Sawabu, T., Seno, H., Kawashima, T., Fukuda, A., Uenoyama, Y., Kawada, M., Kanda, N., Sekikawa, A., Fukui, H., Yanagita, M., Yoshiyoshi, H., Satoh, S., Sakai, Y., Nakano, T., and Chiba, T. (2007). Growth arrest-specific gene 6 and Axl signaling enhances gastric cancer cell survival via Akt pathway. *Mol. Carcinog.* 46, 155-164.
- Schaller, M.D., Borgman, C.A., Cobb, B.S., Vines, R.R., Reynolds, A.B., and Parsons, J.T. (1992). pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 5192-5196.
- Schaller, M.D., Hildebrand, J.D., Shannon, J.D., Fox, J.W., Vines, R.R., and Parsons, J.T. (1994). Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol. Cell Biol.* 14, 1680-1688.
- Schauer, I.E., Siriwardana, S., Langan, T.A., and Sclafani, R.A. (1994). Cyclin D1 overexpression vs. retinoblastoma inactivation: implications for growth control evasion in non-small cell and small cell lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 7827-7831.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
- Schlessinger, J. and Ullrich, A. (1992). Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 9, 383-391.
- Schneider, C., King, R.M., and Philipson, L. (1988). Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* 54, 787-793.
- Schneller, M., Vuori, K., and Ruoslahti, E. (1997). Alpha5beta3 integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *EMBO J.* 16, 5600-5607.

- Schulz,A.S., Schleithoff,L., Faust,M., Bartram,C.R., and Janssen,J.W. (1993). The genomic structure of the human UFO receptor. *Oncogene* 8, 509-513.
- Schweitzer,R., Howes,R., Smith,R., Shilo,B.Z., and Freeman,M. (1995). Inhibition of *Drosophila* EGF receptor activation by the secreted protein Argos. *Nature* 376, 699-702.
- Sciot,R., Debiec-Rychter,M., Daugaard,S., Fisher,C., Collin,F., van Glabbeke,M., Verweij,J., Blay,J.Y., and Hogendoorn,P.C. (2008). Distribution and prognostic value of histopathologic data and immunohistochemical markers in gastrointestinal stromal tumours (GISTs): An analysis of the EORTC phase III trial of treatment of metastatic GISTs with imatinib mesylate. *Eur. J. Cancer* 44, 1855-1860.
- Scott,R.P., Eketjall,S., Aineskog,H., and Ibanez,C.F. (2005). Distinct turnover of alternatively spliced isoforms of the RET kinase receptor mediated by differential recruitment of the Cbl ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 280, 13442-13449.
- Scott,R.S., McMahon,E.J., Pop,S.M., Reap,E.A., Caricchio,R., Cohen,P.L., Earp,H.S., and Matsushima,G.K. (2001). Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 411, 207-211.
- Segal,N.H., Pavlidis,P., Antonescu,C.R., Maki,R.G., Noble,W.S., DeSantis,D., Woodruff,J.M., Lewis,J.J., Brennan,M.F., Houghton,A.N., and Cordon-Cardo,C. (2003). Classification and subtype prediction of adult soft tissue sarcoma by functional genomics. *Am. J. Pathol.* 163, 691-700.
- Seidel,C., Bartel,F., Rastetter,M., Bluemke,K., Wurl,P., Taubert,H., and Dammann,R. (2005). Alterations of cancer-related genes in soft tissue sarcomas: hypermethylation of RASSF1A is frequently detected in leiomyosarcoma and associated with poor prognosis in sarcoma. *Int. J. Cancer* 114, 442-447.
- Seitz,H.M., Camenisch,T.D., Lemke,G., Earp,H.S., and Matsushima,G.K. (2007). Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. *J. Immunol.* 178, 5635-5642.
- Shah,B.H., Soh,J.W., and Catt,K.J. (2003). Dependence of gonadotropin-releasing hormone-induced neuronal MAPK signaling on epidermal growth factor receptor transactivation. *J. Biol. Chem.* 278, 2866-2875.
- Shieh,Y.S., Lai,C.Y., Kao,Y.R., Shiah,S.G., Chu,Y.W., Lee,H.S., and Wu,C.W. (2005). Expression of axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression. *Neoplasia* 7, 1058-1064.
- Shimada,S., Ishizawa,T., Ishizawa,K., Matsumura,T., Hasegawa,T., and Hirose,T. (2006). The value of MDM2 and CDK4 amplification levels using real-time polymerase chain reaction for the differential diagnosis of liposarcomas and their histologic mimickers. *Hum. Pathol.* 37, 1123-1129.
- Shmookler,B.M. and Lauer,D.H. (1983). Retroperitoneal leiomyosarcoma. A clinicopathologic analysis of 36 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 7, 269-280.

Sieg,D.J., Hauck,C.R., Ilic,D., Klingbeil,C.K., Schaefer,E., Damsky,C.H., and Schlaepfer,D.D. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat. Cell Biol.* 2, 249-256.

Simon,M.P., Pedeutour,F., Sirvent,N., Grosgeorge,J., Minoletti,F., Coindre,J.M., Terrier-Lacombe,M.J., Mandahl,N., Craver,R.D., Blin,N., Sozzi,G., Turc-Carel,C., O'Brien,K.P., Kedra,D., Fransson,I., Guilbaud,C., and Dumanski,J.P. (1997). Deregulation of the platelet-derived growth factor B-chain gene via fusion with collagen gene COL1A1 in dermatofibrosarcoma protuberans and giant-cell fibroblastoma. *Nat. Genet.* 15, 95-98.

Simpson,L. and Parsons,R. (2001). PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp. Cell Res.* 264, 29-41.

Sirvent,N., Coindre,J.M., Maire,G., Hostein,I., Keslair,F., Guillou,L., Ranchere-Vince,D., Terrier,P., and Pedeutour,F. (2007). Detection of MDM2-CDK4 amplification by fluorescence in situ hybridization in 200 paraffin-embedded tumor samples: utility in diagnosing adipocytic lesions and comparison with immunohistochemistry and real-time PCR. *Am. J. Surg. Pathol.* 31, 1476-1489.

Skubitz,K.M. and Skubitz,A.P. (2003). Differential gene expression in leiomyosarcoma. *Cancer* 98, 1029-1038.

Slamon,D.J., Clark,G.M., Wong,S.G., Levin,W.J., Ullrich,A., and McGuire,W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177-182.

Song,K.S., Park,Y.S., and Kim,H.K. (2000). Prevalence of anti-protein S antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 43, 557-560.

Soni,R., Muller,L., Furet,P., Schoepfer,J., Stephan,C., Zumstein-Mecker,S., Fretz,H., and Chaudhuri,B. (2000). Inhibition of cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) by faspaplysin, a marine natural product. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 877-884.

Stenhoff,J., Dahlback,B., and Hafizi,S. (2004). Vitamin K-dependent Gas6 activates ERK kinase and stimulates growth of cardiac fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 871-878.

Stitt,T.N., Conn,G., Gore,M., Lai,C., Bruno,J., Radziejewski,C., Mattsson,K., Fisher,J., Gies,D.R., Jones,P.F., and . (1995). The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell* 80, 661-670.

Stommel,J.M., Kimmelman,A.C., Ying,H., Nabioullin,R., Ponugoti,A.H., Wiedemeyer,R., Stegh,A.H., Bradner,J.E., Ligon,K.L., Brennan,C., Chin,L., and DePinho,R.A. (2007). Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science* 318, 287-290.

Stout,A.P. and HILL,W.T. (1958). Leiomyosarcoma of the superficial soft tissues. *Cancer* 11, 844-854.

Stratton,M.R., Moss,S., Warren,W., Patterson,H., Clark,J., Fisher,C., Fletcher,C.D., Ball,A., Thomas,M., Gusterson,B.A., and . (1990). Mutation of the p53 gene in human soft tissue sarcomas: association with abnormalities of the RB1 gene. *Oncogene* 5, 1297-1301.

- Suarez,P.E., Tenev,T., Gross,S., Stoyanov,B., Ogata,M., and Bohmer,F.D. (1999). The transmembrane protein tyrosine phosphatase RPTPsigma modulates signaling of the epidermal growth factor receptor in A431 cells. *Oncogene 18*, 4069-4079.
- Sun,W., Fujimoto,J., and Tamaya,T. (2004). Coexpression of Gas6/Axl in human ovarian cancers. *Oncology 66*, 450-457.
- Sun,W.S., Fujimoto,J., and Tamaya,T. (2003). Clinical implications of coexpression of growth arrest-specific gene 6 and receptor tyrosine kinases Axl and Sky in human uterine leiomyoma. *Mol. Hum. Reprod. 9*, 701-707.
- Sun,W.S., Misao,R., Iwagaki,S., Fujimoto,J., and Tamaya,T. (2002). Coexpression of growth arrest-specific gene 6 and receptor tyrosine kinases, Axl and Sky, in human uterine endometrium and ovarian endometriosis. *Mol. Hum. Reprod. 8*, 552-558.
- Tabone-Eglinger,S., Subra,F., El Sayadi,H., Alberti,L., Tabone,E., Michot,J.P., Theou-Anton,N., Lemoine,A., Blay,J.Y., and Emile,J.F. (2008). KIT mutations induce intracellular retention and activation of an immature form of the KIT protein in gastrointestinal stromal tumors. *Clin. Cancer Res. 14*, 2285-2294.
- Tada,A., Wada,Y., Sato,H., Itabashi,T., Kawamura,M., Tamai,M., and Nishida,K. (2006). Screening of the MERTK gene for mutations in Japanese patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Mol. Vis. 12*, 441-444.
- Tamura,M., Gu,J., Tran,H., and Yamada,K.M. (1999). PTEN gene and integrin signaling in cancer. *J. Natl. Cancer Inst. 91*, 1820-1828.
- Tanaka,K., Nagayama,Y., Nakano,T., Takamura,N., Namba,H., Fukada,S., Kuma,K., Yamashita,S., and Niwa,M. (1998). Expression profile of receptor-type protein tyrosine kinase genes in the human thyroid. *Endocrinology 139*, 852-858.
- Tang,Z., Du,R., Jiang,S., Wu,C., Barkauskas,D.S., Richey,J., Molter,J., Lam,M., Flask,C., Gerson,S., Dowlati,A., Liu,L., Lee,Z., Halmos,B., Wang,Y., Kern,J.A., and Ma,P.C. (2008). Dual MET-EGFR combinatorial inhibition against T790M-EGFR-mediated erlotinib-resistant lung cancer. *Br. J. Cancer 99*, 911-922.
- Tavazoie,S.F., Alarcon,C., Oskarsson,T., Padua,D., Wang,Q., Bos,P.D., Gerald,W.L., and Massague,J. (2008). Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature 451*, 147-152.
- Taylor,A.C., Shu,L., Danks,M.K., Poquette,C.A., Shetty,S., Thayer,M.J., Houghton,P.J., and Harris,L.C. (2000). P53 mutation and MDM2 amplification frequency in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines. *Med. Pediatr. Oncol. 35*, 96-103.
- Taylor,I.C., Roy,S., Yaswen,P., Stampfer,M.R., and Varmus,H.E. (1995). Mouse mammary tumors express elevated levels of RNA encoding the murine homology of SKY, a putative receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem. 270*, 6872-6880.
- Thien,C.B. and Langdon,W.Y. (2001). Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2*, 294-307.



- Thien,C.B. and Langdon,W.Y. (2005). Negative regulation of PTK signalling by Cbl proteins. *Growth Factors* 23, 161-167.
- Todt,J.C., Hu,B., and Curtis,J.L. (2004). The receptor tyrosine kinase MerTK activates phospholipase C gamma2 during recognition of apoptotic thymocytes by murine macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 75, 705-713.
- Trojani,M., Contesso,G., Coindre,J.M., Rouesse,J., Bui,N.B., de Mascarel,A., Goussot,J.F., David,M., Bonichon,F., and Lagarde,C. (1984). Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *Int. J. Cancer* 33, 37-42.
- Trusolino,L., Bertotti,A., and Comoglio,P.M. (2001). A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell* 107, 643-654.
- Tsang,M. and Dawid,I.B. (2004). Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway. *Sci. STKE.* 2004, e17.
- Tschernutter,M., Jenkins,S.A., Waseem,N.H., Saihan,Z., Holder,G.E., Bird,A.C., Bhattacharya,S.S., Ali,R.R., and Webster,A.R. (2006). Clinical characterisation of a family with retinal dystrophy caused by mutation in the Mertk gene. *Br. J. Ophthalmol.* 90, 718-723.
- Tsou,A.P., Wu,K.M., Tsen,T.Y., Chi,C.W., Chiu,J.H., Lui,W.Y., Hu,C.P., Chang,C., Chou,C.K., and Tsai,S.F. (1998). Parallel hybridization analysis of multiple protein kinase genes: identification of gene expression patterns characteristic of human hepatocellular carcinoma. *Genomics* 50, 331-340.
- Vajkoczy,P., Knyazev,P., Kunkel,A., Capelle,H.H., Behrndt,S., Tengg-Kobligk,H., Kiessling,F., Eichelsbacher,U., Essig,M., Read,T.A., Erber,R., and Ullrich,A. (2006). Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 5799-5804.
- van Ginkel,P.R., Gee,R.L., Shearer,R.L., Subramanian,L., Walker,T.M., Albert,D.M., Meisner,L.F., Varnum,B.C., and Polans,A.S. (2004). Expression of the receptor tyrosine kinase Axl promotes ocular melanoma cell survival. *Cancer Res.* 64, 128-134.
- van Glabbeke,M., van Oosterom,A.T., Oosterhuis,J.W., Mouridsen,H., Crowther,D., Somers,R., Verweij,J., Santoro,A., Buesa,J., and Tursz,T. (1999). Prognostic factors for the outcome of chemotherapy in advanced soft tissue sarcoma: an analysis of 2,185 patients treated with anthracycline-containing first-line regimens--a European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Study. *J. Clin. Oncol.* 17, 150-157.
- van Unnik,J.A., Coindre,J.M., Contesso,C., Albus-Lutter,C.E., Schiodt,T., Sylvester,R., Thomas,D., Bramwell,V., and Mouridsen,H.T. (1993). Grading of soft tissue sarcomas: experience of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur. J. Cancer* 29A, 2089-2093.
- Varambally,S., Yu,J., Laxman,B., Rhodes,D.R., Mehra,R., Tomlins,S.A., Shah,R.B., Chandran,U., Monzon,F.A., Becich,M.J., Wei,J.T., Pienta,K.J., Ghosh,D., Rubin,M.A., and Chinnaiyan,A.M. (2005). Integrative genomic and proteomic analysis of prostate cancer reveals signatures of metastatic progression. *Cancer Cell* 8, 393-406.

- Varela-Duran, J., Oliva, H., and Rosai, J. (1979). Vascular leiomyosarcoma: the malignant counterpart of vascular leiomyoma. *Cancer* 44, 1684-1691.
- Varnum, B.C., Young, C., Elliott, G., Garcia, A., Bartley, T.D., Fridell, Y.W., Hunt, R.W., Trail, G., Clogston, C., Toso, R.J., and . (1995). Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature* 373, 623-626.
- Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., Fotouhi, N., and Liu, E.A. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844-848.
- Verweij, J., Casali, P.G., Zalcberg, J., LeCesne, A., Reichardt, P., Blay, J.Y., Issels, R., van Oosterom, A., Hogendoorn, P.C., van Glabbeke, M., Bertulli, R., and Judson, I. (2004). Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet* 364, 1127-1134.
- Vinos, J. and Freeman, M. (2000). Evidence that Argos is an antagonistic ligand of the EGF receptor. *Oncogene* 19, 3560-3562.
- Wai, D.H., Knezevich, S.R., Lucas, T., Jansen, B., Kay, R.J., and Sorensen, P.H. (2000). The ETV6-NTRK3 gene fusion encodes a chimeric protein tyrosine kinase that transforms NIH3T3 cells. *Oncogene* 19, 906-915.
- Wang, R., Lu, Y.J., Fisher, C., Bridge, J.A., and Shipley, J. (2001). Characterization of chromosome aberrations associated with soft-tissue leiomyosarcomas by twenty-four-color karyotyping and comparative genomic hybridization analysis. *Genes Chromosomes. Cancer* 31, 54-64.
- Wang, Z., Wang, D.Z., Hockemeyer, D., McAnally, J., Nordheim, A., and Olson, E.N. (2004). Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature* 428, 185-189.
- Wang, Z., Wang, D.Z., Pipes, G.C., and Olson, E.N. (2003). Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 7129-7134.
- Wary, K.K., Mainiero, F., Isakoff, S.J., Marcantonio, E.E., and Giancotti, F.G. (1996). The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* 87, 733-743.
- Waterman, H., Katz, M., Rubin, C., Shtiegman, K., Lavi, S., Elson, A., Jovin, T., and Yarden, Y. (2002). A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling. *EMBO J.* 21, 303-313.
- Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- Weiner, T.M., Liu, E.T., Craven, R.J., and Cance, W.G. (1993). Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet* 342, 1024-1025.
- West, R.B., Rubin, B.P., Miller, M.A., Subramanian, S., Kaygusuz, G., Montgomery, K., Zhu, S., Marinelli, R.J., De Luca, A., Downs-Kelly, E., Goldblum, J.R., Corless, C.L., Brown, P.O., Gilks, C.B., Nielsen, T.O., Huntsman, D., and van de, R.M. (2006). A landscape effect in

tenosynovial giant-cell tumor from activation of CSF1 expression by a translocation in a minority of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 690-695.

Wile,A.G., Evans,H.L., and Romsdahl,M.M. (1981). Leiomyosarcoma of soft tissue: a clinicopathologic study. *Cancer* *48*, 1022-1032.

Wilsbacher,J.L., Zhang,Q., Tucker,L.A., Hubbard,R.D., Sheppard,G.S., Bamaung,N.Y., Fidanze,S.D., Wang,G.T., Hu,X., Davidsen,S.K., Bell,R.L., and Wang,J. (2008). Insulin-like growth factor-1 receptor and ErbB kinase inhibitor combinations block proliferation and induce apoptosis through cyclin D1 reduction and Bax activation. *J. Biol. Chem.* *283*, 23721-23730.

Wimmel,A., Glitz,D., Kraus,A., Roeder,J., and Schuermann,M. (2001). Axl receptor tyrosine kinase expression in human lung cancer cell lines correlates with cellular adhesion. *Eur. J. Cancer* *37*, 2264-2274.

Wong,E.S., Fong,C.W., Lim,J., Yusoff,P., Low,B.C., Langdon,W.Y., and Guy,G.R. (2002). Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signalling. *EMBO J.* *21*, 4796-4808.

Wu,C.W., Li,A.F., Chi,C.W., Lai,C.H., Huang,C.L., Lo,S.S., Lui,W.Y., and Lin,W.C. (2002). Clinical significance of AXL kinase family in gastric cancer. *Anticancer Res.* *22*, 1071-1078.

Wu,Y., Singh,S., Georgescu,M.M., and Birge,R.B. (2005). A role for Mer tyrosine kinase in alphavbeta5 integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *J. Cell Sci.* *118*, 539-553.

Wu,Y.M., Robinson,D.R., and Kung,H.J. (2004). Signal pathways in up-regulation of chemokines by tyrosine kinase MER/NYK in prostate cancer cells. *Cancer Res.* *64*, 7311-7320.

Xiong,W., Chen,Y., Wang,H., Wang,H., Wu,H., Lu,Q., and Han,D. (2008). Gas6 and the Tyro 3 receptor tyrosine kinase subfamily regulate the phagocytic function of Sertoli cells. *Reproduction.* *135*, 77-87.

Xu,D., Makkinje,A., and Kyriakis,J.M. (2005). Gene 33 is an endogenous inhibitor of epidermal growth factor (EGF) receptor signaling and mediates dexamethasone-induced suppression of EGF function. *J. Biol. Chem.* *280*, 2924-2933.

Yanagisawa,K., Shyr,Y., Xu,B.J., Massion,P.P., Larsen,P.H., White,B.C., Roberts,J.R., Edgerton,M., Gonzalez,A., Nadaf,S., Moore,J.H., Caprioli,R.M., and Carbone,D.P. (2003). Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet* *362*, 433-439.

Yanagita,M., Arai,H., Ishii,K., Nakano,T., Ohashi,K., Mizuno,K., Varnum,B., Fukatsu,A., Doi,T., and Kita,T. (2001). Gas6 regulates mesangial cell proliferation through Axl in experimental glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* *158*, 1423-1432.

Yang,J.C., Chang,A.E., Baker,A.R., Sindelar,W.F., Danforth,D.N., Topalian,S.L., DeLaney,T., Glatstein,E., Steinberg,S.M., Merino,M.J., and Rosenberg,S.A. (1998). Randomized prospective study of the benefit of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcomas of the extremity. *J. Clin. Oncol.* *16*, 197-203.

Yu,X., Miyamoto,S., and Mekada,E. (2000). Integrin alpha 2 beta 1-dependent EGF receptor activation at cell-cell contact sites. *J. Cell Sci.* *113 (Pt 12)*, 2139-2147.

Yusoff,P., Lao,D.H., Ong,S.H., Wong,E.S., Lim,J., Lo,T.L., Leong,H.F., Fong,C.W., and Guy,G.R. (2002). Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf. *J. Biol. Chem.* *277*, 3195-3201.

Zantek,N.D., Walker-Daniels,J., Stewart,J., Hansen,R.K., Robinson,D., Miao,H., Wang,B., Kung,H.J., Bissell,M.J., and Kinch,M.S. (2001). MCF-10A-NeoST: a new cell system for studying cell-ECM and cell-cell interactions in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *7*, 3640-3648.

Zheng,D., Kurenova,E., Ucar,D., Golubovskaya,V., Magis,A., Ostrov,D., Cance,W.G., and Hochwald,S.N. (2009a). Targeting of the protein interaction site between FAK and IGF-1R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *388*, 301-305.

Zheng,Y., Zhang,L., Lu,Q., Wang,X., Yu,F., Wang,X., and Lu,Q. (2009b). NGF-induced Tyro3 and Axl function as survival factors for differentiating PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *378*, 371-375.

Zhu,S., Wurdak,H., Wang,Y., Galkin,A., Tao,H., Li,J., Lyssiotis,C.A., Yan,F., Tu,B.P., Miraglia,L., Walker,J., Sun,F., Orth,A., Schultz,P.G., and Wu,X. (2009). A genomic screen identifies TYRO3 as a MITF regulator in melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *106*, 17025-17030.

**Table 1: Clinical presentation in the 2 groups**

Patient Id	Proteomic Group	Age	Sex	Grade	Site of the primary	Clinical Status	Tyro3	Gas 6	Axl	Phospho Axl	Akt	Phospho Akt	Erk1/2	Phospho Erk
LMS 1	1	80	M	3	Shoulder	NED	+++	0	+	++	++	+	++	++
LMS 3	1	55	F	2	Retroperitoneum	DOD	+++	+++	0	++	++	++	++	++
LMS 4	1	64	F	3	Thigh	NED	+	+++	++	+	+++	++	+++	+++
LMS 5	1	75	M	3	Thigh	DOD	++	+	+	+	++	++	++	++
LMS 6	1	64	F	3	Thigh	DOD	+	0	+	+	++	0	+	0
LMS 2	1	71	F	2	Thigh	DOD	++	+++	++	++	++	+++	++	0
LMS 11	2	69	M	3	Abdominal wall	DOD	++	0	+++	+	+++	0	++	0
LMS 9	2	72	F	3	Trunk wall	DOD	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++
LMS 10	2	69	M	2	Leg	DOD	+	++	+	++	+++	+++	+++	+++
LMS 8	2	65	F	3	Pelvis	NED	+	0	++	+	++	+	+++	++++
LMS 7	2	80	F	2	Arm	AWD	+++	0	++	+	+++	+	++	0
LMS 12	2	53	F	3	Uterus	Lost F.UP	+	+++	+	+	++	+++	++	+
LMS 13	2	67	F	3	Retroperitoneum	NED	+	+++	+	++	++	++	+++	+++





# Traitement ciblé des sarcomes

## Targeted therapy of sarcomas

Philippe A. CASSIER<sup>1,2</sup>  
Armelle DUFRESNE<sup>1,2</sup>  
Hiba EL SAYADI<sup>3</sup>  
Daniel PISSALOUX<sup>3</sup>  
Laurent ALBERTI<sup>3</sup>  
Anne Valérie DECOUVELAERE<sup>3</sup>  
Dominique RANCHERE<sup>3</sup>  
Isabelle RAY-COQUARD<sup>3</sup>  
Jean-Yves BLAY<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Hôpital Édouard-Herriot,  
Service d'oncologie médicale,  
Lyon, France

<sup>2</sup> Université de Lyon,  
Faculté de médecine Lyon-I,  
Lyon, France

<sup>3</sup> Centre Léon-Bérard,  
Lyon, France

**Résumé.** Les progrès récents en matière de biologie des sarcomes des tissus mous et des tissus conjonctifs localement agressifs ont permis de mieux appréhender les différentes entités moléculaires et histologiques de la maladie. Six sous-types bien différenciés ont été identifiés présentant des anomalies moléculaires spécifiques : 1) translocations spécifiques aboutissant à la constitution de gènes de fusion codant des protéines qui agissent comme des facteurs de croissance (EWS/Flil dans le sarcome d'Ewing, PDGF-COL1A1 dans le DFSP) ; 2) mutations touchant les récepteurs à tyrosine kinases (KIT dans les GIST) ; 3) délétion de gènes suppresseurs de tumeur (NF1 impliqué dans la neurofibromatose de type 1 ou INI1 dans les tumeurs rhabdoïdes) ; 4) altérations génétiques simples (amplification de mdm2/cdk4 dans les liposarcomes bien différenciés ou dédifférenciés) ; 5) altérations génétiques plus grossières (comme dans le cas du léiomyosarcome) ; 6) altération des voies de l'adhésion cellulaire (délétion du gène APC ou mutation de la  $\beta$ -caténine dans les fibromatoses agressives). Avec la généralisation des nouvelles techniques de biologie moléculaire, cette classification est actuellement en pleine évolution. L'identification de mutations constitutionnelles spécifiques a permis le développement d'agents thérapeutiques ciblés efficaces contre certains sous-types histologiques de sarcomes. L'un des exemples les plus intéressants est l'identification de mutations activatrices de KIT et de PDGFRA, responsables de la transformation tumorale dans les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST), qui a amené le développement de plusieurs molécules ciblées comme l'imatinib, le sunitinib, le nilotinib, ou encore l'inhibiteur des HSP90 IPI-504. L'imatinib est utilisé dans le traitement des DFSP, caractérisés par une translocation du gène PDGF, ou dans les synovites villonodulaires pigmentées (PVNS), une tumeur des tissus mous également localement agressive, et liée à une anomalie du gène codant pour le M-CSF. Plusieurs essais cliniques de phase I et II ont permis de mettre en évidence des réponses à l'anticorps anti-IGF1R dans les tumeurs du premier sous-type, les sarcomes d'Ewing, dans lesquelles le produit du gène de fusion régule la protéine IGF1R. Des inhibiteurs de CDK4 et MDM2 sont en cours d'évaluation clinique dans le quatrième sous-type. D'autres approches plus empiriques sont actuellement étudiées : agents anti-angiogéniques (pazopanib, sorafenib) et inhibiteurs de mTOR (deforolimus) pour lesquels des essais de phase II ont démontré une activité dans certains sous-types de sarcomes. Les inhibiteurs de mTOR sont également en cours d'évaluation dans des essais de phase II et III. La caractérisation moléculaire des sarcomes a permis de développer des thérapies ciblées visant à corriger les anomalies responsables. La recherche de transfert constitue un outil essentiel pour le développement de nouveaux traitements et l'identification des mécanismes de réponse et de résistance mis en place par ces tumeurs. ▲

**Mots clés :** sarcome, tumeur stromale gastro-intestinale, GIST, chimiothérapie, thérapie ciblée, angiogenèse, mTOR, KIT, PDGFR

**Abstract.** Recent progress made in the field of sarcoma biology has shed new light on the pathophysiology of these numerous but rare diseases. Soft tissue sarcomas can be divided into 6 sub-types based on the underlying molecular biology of the disease : 1) translocation leading to fusion proteins involving transcription factors or growth factors (Ewing sarcoma, myxoid liposarcoma, dermatofibrosarcoma protuberans) ; 2) tyrosine kinase receptor mutations (gastrointestinal stromal tumors) ; 3) tumor-suppressor gene deletion (type 1 neurofibromatosis, rhabdoid tumors) ; 4) genetic alteration such as amplification of chromosomal regions (well differentiated/dedifferentiated liposarcoma) ; 5) sarcomas with more complex genetic altera-

tions (leiomyosarcoma) and 6) abnormalities involving the cell-adhesion pathways (aggressive fibromatosis). Together with the current development of numerous targeted therapies, these recent progress are the basis of tomorrow's personalised medicine for patients with soft tissue sarcoma. ▲

**Key words:** sarcoma, gastrointestinal stroma tumors, GIST, chemotherapy, targeted therapy, angiogenesis, mTOR, KIT, PDGFR

## Introduction

Les sarcomes rassemblent un groupe de tumeurs rares et hétérogènes qui représentent environ 1 à 2 % de l'ensemble des tumeurs malignes des tissus conjonctifs [1]. Leur incidence annuelle, tous sites confondus, est mal connue mais les chiffres habituellement proposés sont certainement en deçà de la réalité. On estime qu'entre 5 et 7 nouveaux cas pour 100 000 habitants sont diagnostiqués chaque année. L'identification des altérations moléculaires associées aux différents sous-types de la maladie, en particulier les mutations précoces acquises au cours de la progression tumorale et qui caractérisent les différentes entités nosologiques – translocations, mutation de la tyrosine kinase [2, 3], ont permis le développement de traitements ciblant spécifiquement les anomalies responsables de la transformation maligne.

De très nombreuses altérations génomiques ont été observées et les sarcomes sont actuellement subdivisés en entités moléculaires et histologiques bien distinctes. Il est à noter, toutefois, que cette classification évolue rapidement. Six sous-types de tumeurs conjonctives ont ainsi été identifiés, en fonction des anomalies moléculaires rencontrées : 1) translocations spécifiques aboutissant à la constitution de gènes de fusion codant des modulateurs de transcription ou des protéines qui agissent comme des facteurs de croissance (EWS/Flil dans le sarcome d'Ewing, PDGF-COL1A1 dans le dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand -DFSP) [4, 5] ; 2) mutations touchant les récepteurs à tyrosine kinases (KIT et PDGFRA dans les GIST) [6, 7] ; 3) délétion de gènes suppresseurs de tumeur (NF1 impliqué dans la neurofibromatose de type 1 ou INI1 dans les tumeurs rhabdoïdes) [8, 9] ; 4) altérations génétiques simples (amplification de *mdm2/cdk4* dans les liposarcomes bien différenciés ou dédifférenciés) [10, 11] ; 5) altérations génétiques plus grossières (comme dans le cas du leiomyosarcome) [12, 13] ; 6) altération des voies de l'adhésion cellulaire (délétion du gène APC ou mutation de la  $\beta$ -caténine dans les fibromatoses agressives) [14, 15].

Les nouvelles stratégies thérapeutiques développées pour le traitement de ces tumeurs suivent toutes ce même principe de ciblage spécifique des différents sous-types moléculaires et histologiques [16]. Le ciblage de KIT par des inhibiteurs spécifiques de tyrosine kinase (imatinib, sunitinib, et plus récemment nilotinib) est le premier traitement ciblé ayant démontré un gain de survie chez des patients par ailleurs résistants à la chimiothérapie et à la radiothérapie [17-19].

Certaines molécules ciblant le récepteur de l'IGF1 (IGF1R), la cible moléculaire de la rapamycine (mTOR), les récepteurs erbB (EGFR, HER2), certains facteurs angiogéniques ou des protéines de choc thermique (heat shock protein, HSP) ont fait l'objet d'essais cliniques ou sont en cours d'évaluation dans d'autres sous-types histologiques [20-27]. En ce qui concerne les cytotoxiques, certains agents ont une efficacité

spécifique reconnue, comme la trabectedin-ET743 ou l'association gemcitabine-docetaxel dans les leiomyosarcomes et les liposarcomes [28-30], les taxanes, et les drogues ciblant les microtubules dans les angiosarcomes [31, 32]. En 2008, les nouveaux cytotoxiques en cours d'évaluation clinique sont ainsi stratifiés selon le sous-type histologique de la tumeur traitée.

Nous reverrons ci-après les options thérapeutiques actuellement disponibles pour le traitement des sarcomes et des GIST. Nous évaluerons ensuite les progrès accomplis vers un traitement ciblé des patients.

## Le paradigme : traitement cible des GIST

Les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST), qui se développent à partir des cellules interstitielles de Cajal, peuvent toucher n'importe quelle partie du tractus digestif, et plus particulièrement l'estomac et l'intestin grêle [33]. Leur incidence est d'environ 1,5 cas pour 100 000 personnes [34, 35]. L'analyse immunohistochimique montre une positivité du CD117/KIT dans 95 % des cas. Malgré son manque de spécificité et son expression irrégulière dans ces tumeurs rares, la protéine KIT est cependant considérée comme le marqueur incontournable des GIST [33]. En 1998, Hirota *et al.* ont identifié une mutation activatrice du gène KIT codant pour le récepteur d'un facteur de croissance, le *stem cell factor* [6], et il est actuellement admis que 75 à 80 % des GIST présentent une telle mutation [33]. Sont concernés essentiellement les exons 11 et 9 (dans respectivement 30 et 10 % des cas), et de manière moins fréquentes les exons 13, 14 et 17 (0,5 à 1 % des cas) [33]. Plus récemment on a identifié un sous-groupe de GIST ne présentant pas de mutations de KIT mais des mutations activatrices du gène codant pour le PDGFRA (*platelet-derived growth factor receptor alpha*) [7]. Ces mutations, que l'on retrouve dans 5 à 7 % des tumeurs avancées et probablement plus fréquemment dans les tumeurs localisées, sont mutuellement exclusives avec les mutations de KIT. Seuls 12 à 15 % des GIST ne sont associés à aucune mutation ; ceci concerne essentiellement les formes pédiatriques ou les GIST survenant dans le cadre d'une neurofibromatose de Recklinghausen (NF1) ou d'un syndrome de Carney. Des mutations de KIT et de PDGFR ont été mises en évidence dans des biopsies tumorales de GIST de stade précoce et, plus récemment, dans les GIST asymptomatiques trouvées à l'autopsie chez 30 % des individus normaux [36].

En 2008, la qualité de la résection chirurgicale reste un élément essentiel de la prise en charge chez les patients porteurs de tumeurs localisées [37-39]. L'exérèse chirurgicale doit être complète, en évitant toutefois de rompre la tumeur de manière à éviter la diffusion des cellules cancéreuses dans l'organisme, principalement dans la cavité péritonéale. Plusieurs facteurs pronostiques ont été identifiés dans les formes localisées. La classification histo-pronostique est fon-



dée sur deux critères principaux qui sont la taille de la tumeur primitive et l'index mitotique évalué sur 50 champs à fort grossissement. Le site tumoral et éventuellement la nature des mutations ont également un impact sur le devenir des patients et ces deux critères devraient prochainement être intégrés à la décision thérapeutique [40, 41].

Dans les formes avancées, au contraire, le rôle de la chirurgie reste à démontrer, même si certaines rémissions passagères sont parfois observées après résection complète de tumeurs métastasiées [42-44]. Dans ces stades avancés, les recommandations actuelles préconisent l'utilisation d'imatinib mésylate (400 mg/jour) en première ligne de traitement [39, 45, 46]. Le délai moyen avant progression chez les patients traités par imatinib est de 2 ans. Une résistance primaire au traitement est observée chez 5 % des patients, tandis qu'une majorité d'entre eux développent une résistance secondaire précoce (1 an) ou tardive [17-19, 47]. Chez les patients en progression, l'imatinib à la dose de 800 mg/jour permet le contrôle de la tumeur dans 30 à 35 % des cas, avec une survie sans progression de 4 mois en moyenne [48]. Les résultats d'une méta-analyse de deux études randomisées comparant les deux niveaux de dose d'imatinib (400 mg/jour vs. 800 mg/jour) ont été présentés au congrès de l'ASCO 2007. Cette étude a démontré la supériorité de la plus forte dose, avec un allongement de la survie sans progression chez les patients porteurs de mutations de l'exon 9 [49]. Les recommandations publiées à l'issue de l'ESMO 2008 préconisent l'utilisation de l'imatinib 800 mg/jour, désormais considéré comme le traitement standard de première ligne dans cette indication [46]. L'étude BRF14 a cherché à évaluer si l'interruption du traitement était envisageable après 1 ou 3 ans de traitement. Les résultats ont montré un taux élevé (>90 %) de progression chez les patients atteints de GIST avancés avec une médiane de survie sans progression de 6 mois après l'interruption du traitement [47, 50]. Même si la reprise de l'imatinib a permis d'obtenir un nouveau contrôle de la maladie chez la plupart des patients, l'impact de cette interruption sur la survie globale reste à déterminer.

En 2006, le sunitinib a reçu une AMM en traitement de seconde intention pour les patients en échec de traitement par imatinib (toxicité ou progression). L'efficacité de ce traitement a été prouvée, avec 8 % de réponses complètes (RC) ou partielles (RP), 60 % de stabilisations de la maladie (SD), et une médiane de survie sans progression proche de 6 mois chez les patients résistants à l'imatinib [51].

D'autres molécules ciblant KIT et PDGFRA ont également donné des résultats prometteurs. C'est le cas du nilotinib, initialement utilisé en traitement de seconde ligne des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) réfractaires à l'imatinib et qui semble également démontrer une grande efficacité associée à une toxicité acceptable chez les patients porteurs de GIST imatinib-résistants [52]. Un essai de phase I/II a rapporté un taux de RC/RP/SD de 65 % chez les patients résistants à l'imatinib et au sunitinib, avec une médiane de survie sans progression de 23 semaines. Un essai de phase III testant l'efficacité du nilotinib dans les GIST résistants à l'imatinib est en cours ; le recrutement des patients vient de s'achever et les résultats sont attendus.

Parmi les autres molécules en cours d'étude dans les GIST avancés on trouve le PTK787/ZK222584 (PTK/ZK ou vatalanib). Les résultats d'un essai de phase II chez des patients porteurs de GIST réfractaires à l'imatinib présentés au congrès de l'ASCO 2006 et récemment publiés : le PTK/ZK administré

par voie orale a démontré un bénéfice clinique (RC + RP + SD à plus de 3 mois) chez 10 des 15 patients inclus (67 %) [53]. Un autre inhibiteur multifonctionnel de tyrosine kinase, l'AMG 706, permet d'inhiber *in vitro* la phosphorylation de la protéine KIT [54]. Un essai international portant sur 138 patients souffrant de GIST réfractaires à l'imatinib (au minimum 600 mg/jour pendant 8 semaines ou plus) a rapporté un taux de réponse selon RECIST de 3 %, une stabilisation de la maladie pendant 52 jours ou plus chez 46 % des patients, une médiane de survie sans progression de 16 semaines, et 27 % de patients non progressifs à 6 mois [55]. Un autre inhibiteur multifonctionnel des tyrosine kinases initialement développé comme inhibiteur de la protéine kinase C, la molécule PKC412, est aussi potentiellement actif sur d'autres cibles moléculaires, notamment les récepteurs à activité tyrosine kinase c-KIT, VEGFR, PDGFR et Flt3. L'efficacité de cette molécule contre certaines mutations de c-KIT et PDGFRA a été démontrée dans des modèles pré-cliniques [56, 57]. Un essai de phase I/II testant l'efficacité du PKC412 pour le traitement des GIST imatinib-résistants a produit des résultats intéressants qui ont été publiés au congrès de l'ASCO en 2005 [58]. L'étude a cependant révélé une interaction pharmacologique entre PKC412 et imatinib, nécessitant une augmentation de la dose d'imatinib de 600 à 1 000 mg/jour. Le dasatinib est un inhibiteur de tyrosine kinase efficace dans les LMC réfractaires à l'imatinib ; son action inhibitrice de la protéine KIT mutante ou sauvage a également été démontrée *in vitro* [59]. Un essai de phase I a mis en évidence une activité antitumorale transitoire de la molécule dans les GIST et les sarcomes des tissus mous (STM) [60], et un essai de phase II est actuellement en cours. Plusieurs essais de phase II ont testé le sorafénib chez les patients porteurs de GIST réfractaires aussi bien à l'imatinib qu'au sunitinib. Des résultats intéressants ont été obtenus, avec une médiane de survie sans progression de près de 4 mois et au moins une rémission transitoire de la maladie chez 2 patients sur 3 [61]. Enfin, un inhibiteur hydrosoluble des HSP90, l'IPI504, a fait l'objet d'un essai de phase I dans les GIST imatinib-résistants. Les résultats prometteurs rapportés au dernier congrès de l'ASCO en 2008 ont montré une rémission transitoire de la maladie chez 50 % des patients [62].

Quatre essais sont actuellement en cours en Europe, aux États-Unis et au Japon pour tester l'imatinib en situation adjuvante. La première étude (ACOSOG-Z9001) prévoit de comparer l'imatinib à la dose de 400 mg/jour pendant un an versus placebo ; la seconde (EORTC 62024) compare l'effet de l'imatinib 400 mg/jour en thérapie adjuvante pendant 2 ans versus absence de traitement ; finalement, la troisième et la quatrième étude comparent la même dose d'imatinib (400 mg/jour) administrée pendant 1 an versus 3 ans (SSG/AIO) ou pendant 1 an versus 6 mois (étude japonaise). La première étude concerne des patients porteurs de GIST recevant un traitement adjuvant par imatinib après résection complète d'une tumeur de plus de 3 cm, tandis que les trois autres portent sur des patients à risque élevé ou à risque intermédiaire de rechute, avec un risque de rechute à long terme avoisinant les 60-70 %. Les données préliminaires de l'étude ACOSOG présentées au congrès de l'ASCO en 2007 ont montré une réduction importante du risque de rechute, sans que l'on sache si l'imatinib permet de prévenir la rechute ou simplement de la retarder. L'impact du traitement adjuvant

sur la réponse au traitement par imatinib au moment de la rechute métastatique reste également à déterminer [63]. Par ailleurs, l'identification d'un groupe de patients présentant un risque de rechute supérieur à 85 % [46] ainsi que les résultats de l'étude BFR14 soulèvent la question d'une éventuelle prolongation du traitement adjuvant par imatinib (5 ans, vie entière ?).

## Traitement des sarcomes des tissus mous

Les sarcomes des tissus mous représentent environ 2/3 des sarcomes. Le traitement standard associe chirurgie et radiothérapie adjuvante [64-66]. Sauf dans le cas du sarcome d'Ewing des parties molles ou des rhabdomyosarcomes alvéolaires ou embryonnaires des tissus mous, l'addition de chimiothérapie en situation adjuvante n'a pas apporté à ce jour de bénéfice thérapeutique tangible sur la survie. Les résultats d'une importante méta-analyse ont montré une amélioration de la survie sans progression locale ou à distance chez les patients traités par chimiothérapie adjuvante, mais sans bénéfice significatif en ce qui concerne la survie globale [67]. Une étude récente conduite par le Groupe Sarcomes italien a montré une amélioration significative de la survie globale chez les patients porteurs de sarcomes des extrémités à haut risque recevant une chimiothérapie adjuvante à base d'ifosfamide [68]. Cependant, ce bénéfice de survie globale n'a pas été retrouvé à long terme. Les variations individuelles du risque de rechute, le respect de la dose intensité, ou d'autres facteurs qui restent à déterminer peuvent expliquer ces différences. La plus grande étude de chimiothérapie adjuvante par doxorubicine-ifosfamide dans les STM, rapportée en 2007 par le groupe Sarcomes de l'EORTC (EORTC STBSG) à l'ASCO, n'a pas mis en évidence de bénéfice significatif [69].

Chez les patients métastatiques, une chimiothérapie combinée comprenant la doxorubicine reste le traitement standard dans la plupart des sous-types histologiques, même si des taux de réponses de seulement 25 à 35 % ont été obtenus dans la plupart des séries, avec une médiane de survie sans progression de 6 mois et une médiane de survie globale de 12 mois [70-73]. Ces données n'ont que peu ou pas évolué depuis 20 ans. La plupart des combinaisons présentent une toxicité trop importante pour les patients, le plus souvent sans augmenter significativement le taux de survie par rapport à la doxorubicine utilisée seule. Par ailleurs, quel que soit le protocole utilisé, un petit nombre de patients de stade avancé survivent à long terme ; la proportion atteint 20 % chez les patients en réponse complète après traitement de première ligne, mais seulement 3 à 4 % chez ceux qui obtiennent, au mieux, une réponse partielle ou une stabilisation de la maladie [70]. Les sarcomes de stade avancé doivent par conséquent être considérés comme curables, même si le nombre de patients effectivement guéris en 2008 reste modeste.

Il reste par conséquent de nombreux progrès à faire dans la prise en charge des sarcomes des tissus mous ; les traitements les plus innovateurs concernent actuellement les formes métastatiques. Cependant, il faut garder à l'esprit que les premières étapes de la prise en charge, lorsque la maladie est encore localisée, sont cruciales pour prévenir les rechutes et améliorer la survie des patients. Pour les sarcomes opérables, l'amélioration de la prise en charge passe par une modification de la stratégie thérapeutique et l'intervention d'équipes pluridisciplinaires dans des centres spécialisés [1, 74, 75].

Les nouvelles molécules en cours de développement dans cette indication sont de 2 ordres : les agents cytotoxiques et les traitements moléculaires ciblés.

## Nouveaux agents cytotoxiques pour le traitement des sarcomes : le temps des traitements ciblés par sous-type histologique ?

Plusieurs médicaments cytotoxiques comme les taxanes, la trabectedine ou d'autres molécules non encore validées, ont démontré une certaine activité dans les sarcomes.

Parmi les taxanes, le docetaxel et le paclitaxel utilisés à hautes doses induisent *in vitro* l'assemblage des microtubules et inhibent la dépolymérisation de la tubuline. *In vivo* et dans les conditions normales de traitement, ces drogues exercent vraisemblablement un effet déstabilisant sur l'assemblage des microtubules [76]. L'efficacité du docetaxel utilisé seul reste limitée dans les sarcomes et n'a pas été confirmée dans des cohortes de patients non sélectionnés [77, 78]. De la même manière, la gemcitabine, un antimétabolite qui agit par blocage de la synthèse de l'ADN, n'a montré qu'une efficacité relativement faible dans les STM [79]. Cependant, une chimiothérapie combinant les deux agents administrée en première ou deuxième intention a permis d'obtenir des taux de réponse objective importants (18,4 % dans les STM et 53 % dans les leiomyosarcomes), avec une toxicité acceptable [29]. Une étude randomisée de phase II utilisant une méthode statistique originale (méthode bayésienne) a montré la supériorité de la combinaison par rapport à la gemcitabine utilisée seule, avec une amélioration de la survie sans progression et de la survie globale [30]. C'est le premier essai clinique publié rapportant une amélioration de la survie globale dans les sarcomes avancés. Une petite étude randomisée comparant les 2 options et portant exclusivement sur des leiomyosarcomes a été présentée par le Groupe Sarcomes français à l'ASCO 2008, sans toutefois confirmer la supériorité de la combinaison sur la gemcitabine seule. Cette différence de résultats pourrait être imputée au faible nombre de patients inclus dans cette dernière étude [80].

Plusieurs études rétrospectives, et une étude prospective réalisée par le groupe sarcome Français (Penel N *et al.* *J Clin Oncol* 2008 sous presse) ont démontré cependant une activité tumorale significative du paclitaxel dans un sous-type histologique rare comme l'angiosarcome, en particulier les lésions de la tête et du cou, généralement considéré comme résistant à la chimiothérapie après échec de la doxorubicine [31, 81, 82].

L'ecteinascidine 743 (ET743 ou trabectedine) est une molécule naturelle d'origine marine qui se lie de façon covalente dans le petit sillon de l'ADN et bloque le cycle cellulaire au niveau de la transition G2/M. Elle induit une apoptose p53-dépendante et inhibe la transcription des gènes induits. La dose quotidienne recommandée est de 1,5 mg/m<sup>2</sup> en perfusion continue sur 24 heures. Plusieurs essais de phase II testant l'efficacité et la toxicité de ET-743 chez les patients porteurs de sarcomes des tissus mous ont été publiés [83-87]. Tous ont rapporté des taux de réponse relativement faibles (respectivement 4, 8 et 8 %) mais une stabilisation prolongée de la maladie avec des taux de survie sans progression entre 20 et 29 % à 6 mois. Des toxicités modérées, essentiellement hépatiques et hématologiques, ont été observées, avec moins de 10 % de neutropénies fébriles, aucune neutropénie dans l'étude américaine, des thrombocytopénies de grades 3 et 4 chez approximativement 20 % des patients et une élévation

transitoire des transaminases AST et/ou ALT chez 40 à 50 % des patients. ET-743 présente donc une activité antitumorale significative dans les formes avancées, au prix d'une toxicité importante mais gérable. L'efficacité de la molécule en première ligne a fait l'objet d'un essai de phase II rapporté par Garcia-Carbonero *et al.* [85]. L'étude a mis en évidence un taux de réponse légèrement supérieur, avec 17 % de réponses globales et 24 % de survie sans progression à 6 mois. Ce taux de survie sans progression reste de 21 % à 1 an, ce qui tend à prouver que la trabectedine peut avoir un bénéfice prolongé chez les patients répondeurs.

Les résultats préliminaires d'une étude de phase II (STS201) évaluant l'efficacité et la tolérance de la trabectedine soit en perfusion de 24 heures toutes les trois semaines (1,5 mg/m<sup>2</sup>/jour), soit en perfusion hebdomadaire de 3 heures pendant 3 semaines consécutives sur un cycle de 4 semaines (0,58 mg/m<sup>2</sup>) ont montré une amélioration de la survie sans progression et une légère augmentation de la survie globale avec le schéma d'administration sur 3 semaines [88]. Deux essais de phase II ont également été conduits dans les GIST, mais n'ont pas démontré d'efficacité de la trabectedine, avec des taux de réponse nuls et une survie sans progression extrêmement limitée (< 2 mois) [89, 90]. L'ET-743 apparaît donc inefficace dans cette indication. En revanche, le bénéfice clinique peut être particulièrement important dans certains sous-types moléculaires comme les liposarcomes myxoïdes [91].

La brostallicine (Nerviano Medical Science, Nerviano, Italie) est un nouvel agent cytotoxique qui se lie au petit sillon de l'ADN, avec une forte prédisposition pour les séquences riches en AT. Un essai de phase II publié récemment [92] a rapporté des résultats prometteurs dans les STM. L'essai portait sur 64 patients : 21 GIST en échec de traitement par imatinib et 43 non-GIST en progression après chimiothérapie de première ligne. Aucune réponse objective n'a été observée dans le groupe GIST, mais le traitement a permis un certain contrôle de la maladie, avec un taux de survie sans progression de 21 % à 6 mois. Dans le groupe non-GIST, 2 réponses partielles ont été rapportées (5 % survie globale) avec un taux de survie sans progression à 6 mois de 22 %, indiquant là encore une certaine stabilisation de la maladie. Les manifestations toxiques de grade 3-4 étaient pour la plupart hématologiques, avec 14 % des patients présentant une neutropénie fébrile et 16 % une thrombocytopénie. Les toxicités non hématologiques de grade 3-4 comprenaient l'asthénie (25 %) et l'hyperbilirubinémie (10 %). À partir de ces résultats, l'EORTC a mis en place une étude randomisée comparant la brostallicine et la doxorubicine en première ligne de traitement chez des patients porteurs de STS avancés ou métastatiques. Cette étude s'est achevée en 2008.

### Traitements moléculaires ciblés : succès et perspectives des approches rationnelles

L'évolution des connaissances en matière de biologie des sarcomes a permis le développement de traitements spécifiques adaptés à chaque sous-type histologique. À ce jour, et sans surprise, la mise en évidence d'une anomalie moléculaire activatrice – ou récurrente – dans un sous-type histologique donné s'est montrée bien plus efficace pour l'élaboration d'un traitement que la simple expression d'un marqueur spécifique [93].

#### • *Dermatofibrosarcome protuberans*

Le dermatofibrosarcome protuberans de Darier-Ferrand (DFSP) est un sarcome cutané rare à évolution lente et essentiellement locale [5]. Il est caractérisé par une translocation juxtaposant le gène du col1A1 avec le gène du PDGF $\alpha$ , produisant ainsi une protéine de fusion exprimée en excès dans les cellules tumorales et qui agit comme facteur de croissance autocrine [5]. Plusieurs études rétrospectives ou prospectives basées sur l'activité inhibitrice de l'imatinib sur le PDGFRA ont été conduites. Elles ont démontré une activité antitumorale significative de l'imatinib dans cette tumeur, aussi bien dans les formes localisées ou localement avancées que dans les formes métastatiques [5, 94]. Après deux essais de phase II conduits par l'EORTC (62027) et le SARC, l'efficacité de l'imatinib est maintenant reconnue dans cette indication. Il est à noter qu'aucun autre agent n'avait jusque-là été testé prospectivement ni n'avait démontré d'efficacité dans ces tumeurs rares.

#### • *Le rôle de l'imatinib dans le traitement des synovites villonodulaires pigmentées ou tumeurs tenosynoviales à cellules géantes*

La synovite villonodulaire pigmentée (SVNP), appelée également tumeur tenosynoviale à cellules géantes (TTCG), est une maladie rare qui se caractérise par une prolifération cellulaire se développant aux dépens de la synoviale et qui concerne essentiellement les jeunes adultes. Elle a longtemps été considérée comme un phénomène inflammatoire mais des observations récentes ont montré qu'il s'agissait en fait d'une tumeur bénigne associée à des altérations génétiques spécifiques [95, 96]. Une partie des cellules tumorales de SNVP/TTCG présentent une translocation t(1 ; 2) spécifique impliquant le gène du collagène 6A3 et le gène M-CSF (a.k.a CSF1) (sur le chromosome 1p13). Ce gène de fusion exprimé par une partie des cellules code une protéine de fusion qui cible les cellules non néoplasiques M-CSFR par un effet paracrine ("landscape"). Le traitement des SNVP/TTCG repose généralement exclusivement sur la chirurgie. Cependant, en cas de rechute une nouvelle intervention peut être nécessaire, ce qui risque d'entraîner des séquelles fonctionnelles importantes. En plus de son activité inhibitrice sur bcr-abl, KIT et PDGFRA, il a récemment été montré que l'imatinib utilisé à doses thérapeutiques permettait de bloquer l'activation de M-CSFR [97]. Nous avons donc testé l'imatinib en traitement de seconde ligne chez un patient porteur de SNVP/TTCG en rechute après chirurgie. Le patient a présenté une rémission complète, mais des études plus approfondies seront nécessaires pour confirmer l'activité de l'imatinib dans cette indication [98].

#### • *Ciblage de HER1*

L'analyse du profil d'expression génique et l'analyse par microarrays ont montré que plusieurs sous-types histologiques de sarcomes, en particulier les sarcomes synoviaux et les tumeurs des gaines nerveuses périphériques, expriment fortement EGFR [99]. Deux études de phase II ont été conduites dans les STM avancés avec des inhibiteurs de tyrosine kinase : gefitinib dans les sarcomes synoviaux et erlotinib dans les tumeurs des gaines nerveuses périphériques. Aucun des deux traitements n'a montré d'efficacité dans ces indications [22, 100]. Cela montre bien qu'il n'existe pas dans ce modèle de corrélation systématique entre expression de la cible et rôle de cette cible dans la progression tumorale. Une seule

étude a rapporté l'expression de HER2 dans les sarcomes synoviaux et a montré une corrélation entre surexpression de la protéine et amélioration du pronostic, contrairement aux observations rapportées dans le cancer du sein [101]. Un essai clinique testant l'efficacité du trastuzumab seul dans les sarcomes synoviaux de stade avancé ou métastatique est en cours (étude SWOG-S0346).

• *Traitement hormonal du sarcome stromal endométrial*

Des récepteurs d'œstrogène et de progestérone ont été retrouvés dans un sous-groupe de sarcomes utérins, les tumeurs stromales de l'endomètre [102-105]. La plupart de ces sarcomes expriment les récepteurs hormonaux et sont associés à une translocation t(7,17) [105]. Ils représentent une cible potentielle pour les manipulations hormonales [106, 107]. Nous avons analysé rétrospectivement une population de patientes porteuses de sarcome stromal endométrial traitées par des inhibiteurs de l'aromatase (anastrozole et letrosole). Cette analyse a montré une réponse complète chez 2 patientes, une réponse partielle chez 2 autres patientes (taux de réponse globale 50 %), et un taux de survie sans progression de 60 % à 2 ans [107]. En dépit du caractère rétrospectif de cette étude et du nombre limité de patientes, ces résultats sont très encourageants car ils ont montré la bonne tolérance des patientes aux inhibiteurs de l'aromatase.

• *Utilisation de l'IGF1R dans les sarcomes d'Ewing et les autres sarcomes*

Des gènes de fusion codant pour des facteurs transcriptionnels impliqués dans la régulation du gène IGFBP3 ont été identifiés dans les sarcomes d'Ewing. L'expression de IGFBP3 est inhibée par la protéine de fusion. Le gène est impliqué dans la régulation du système IGF1/IGF1R. Les insulin-like growth factors (IGF) et leurs récepteurs (IGFR) sont des facteurs de croissance qui jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus métaboliques et la prolifération cellulaire. Par son interaction avec IGF1 et le gène recombinant, IGFBP3 inhibe la prolifération des cellules et favorise l'apoptose dans les lignées de sarcome d'Ewing [4]. Sur la base de ces données biologiques, des essais de phase I et II utilisant un anticorps IGF1R ont été initiés. Les résultats préliminaires montrent que le traitement permet d'obtenir un contrôle tumoral chez 40 à 50 % des patients réfractaires [20, 21]. Bien que cette tumeur soit très rare (3 à 5 cas par million et par an), plusieurs essais cliniques sont en cours.

• *CDK4 MDM2*

Dans la même optique, l'amplification constante du gène mdm2 et celle plus occasionnelle de CDK4 dans les liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés suggère un intérêt thérapeutique potentiel des inhibiteurs de la protéine dans cette indication [10, 11]. Des inhibiteurs de CDK4 ont été testés dans des études de phase I, mais aucune activité antitumorale n'a été montrée à ce jour [108]. Des études de phase I utilisant des inhibiteurs de mdm2 (les nutlines) ont également été initiées [109]. Il serait également intéressant d'analyser dans ces modèles les altérations moléculaires secondaires du gène JUN récemment décrites [110].

• *L'anticorps anti-RANK ligand dans le traitement des tumeurs osseuses à cellules géantes*

Les tumeurs osseuses à cellules géantes sont une forme rare de tumeurs osseuses, dont l'extension est généralement lo-

cale mais qui peuvent parfois causer des métastases. La croissance des cellules géantes est favorisée par les interactions complexes, sous la dépendance de la voie paracrine RANKL/RANK, entre les cellules tumorales et leur microenvironnement. Très peu d'agents ont démontré une activité antitumorale dans cette indication. Les résultats d'un essai clinique utilisant un anticorps anti-RANKL, le denosumab, ont été rapportés au congrès de l'ASCO en 2008. Le traitement a permis d'obtenir une réponse métabolique, avec reconstruction osseuse et réduction du nombre et de la taille des métastases, dans 85 % des patients traités. Malgré le faible effectif de la cohorte, ces résultats sont encourageants et devront être confirmés sur une population plus importante [111].

• *Antagonistes des estrogènes et imatinib dans les tumeurs desmoïdes*

Les tumeurs desmoïdes sont des tumeurs invasives développées à partir des fibroblastes et des myofibroblastes. Elles sont associées à un taux de récurrence locale ou locorégionale significatif, mais le risque de métastase est le plus souvent nul [112-114]. La caractérisation biologique de ces tumeurs n'a été effectuée que très récemment, et les traitements ont donc été le plus souvent basés sur des données empiriques avec des niveaux de preuve limités. Les tumeurs desmoïdes présentent des altérations moléculaires caractéristiques de la voie APC- $\beta$  caténine. La  $\beta$ -caténine apparaît mutée dans plus de 85 % des fibromatoses desmoïdes, tandis qu'un sous-groupe de tumeurs desmoïdes intra-abdominales est associé à la mutation du gène APC chez les patients porteurs du syndrome de Gardner [14, 15]. Initialement considérées comme des sarcomes de bas grade, la plupart de ces tumeurs peuvent avoir une évolution très lente ou même présenter des régressions spontanées. Par conséquent les traitements proposés dans la littérature sont très disparates [115-117]. Cependant, un certain nombre de tumeurs finissent par progresser et entraîner la mort des patients, en particulier les tumeurs abdominales (jusqu'à 30 %) et, quoique moins fréquemment, celles qui apparaissent au niveau des membres (10 %) [113, 118]. Plusieurs traitements systémiques ont démontré une activité antitumorale dans cette indication : les AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens), les traitements hormonaux, les cytotoxiques utilisés à doses faibles ou standard, ou encore l'imatinib. Bien que reconnue depuis longtemps [115, 117], l'activité des anti-estrogènes reste toutefois difficilement explicable au niveau moléculaire. Il a récemment été montré que les tumeurs desmoïdes expriment fortement le récepteur des estrogènes ER $\beta$  mais pas ER $\alpha$  [119]. De la même manière, l'imatinib a démontré une activité antitumorale significative, et les résultats de deux essais cliniques ont montré des taux de réponse de 15 % et des taux de survie sans progression de 40 et 65 % [120, 121]. Les mécanismes biologiques régulant l'activité antitumorale de l'imatinib dans les tumeurs desmoïdes restent inexplicables. Des études sont en cours. Les premiers essais utilisant l'imatinib étaient fondés sur l'identification d'une surexpression de KIT dans les cellules tumorales (due cependant à un possible artefact au niveau de la procédure d'extraction de l'antigène). Une survie sans progression prolongée a été observée chez certains patients préalablement progressifs. Le traitement devra faire l'objet d'un essai randomisé afin de faire la preuve de son activité antitumorale.

- *L'imatinib dans le traitement des chordomes*

Les cellules chordales expriment le PDGFR à leur surface sous forme phosphorylée [122]. L'imatinib a permis d'induire une stabilisation prolongée de la maladie chez certains patients atteints de chordome [122]. Un essai clinique utilisant l'imatinib en association avec un cytotoxique (le CDDP) est actuellement en cours.

### Thérapies moléculaires ciblées : approches empiriques

De nombreux sarcomes sont associés à des altérations moléculaires affectant la fonction des protéines. Toutefois, dans la plupart des sous-types de sarcomes aucune altération moléculaire responsable, et surtout « traitable », n'a encore été identifiée de façon certaine. Pour ces patients, le ciblage d'une voie biologique commune à différents sous-types histologiques peut représenter une stratégie thérapeutique utile. Il serait intéressant de proposer, de manière empirique, des essais combinant des inhibiteurs de mTOR, du VEGFR, et des modulateurs ciblant les protéines de stress (heat-shock proteins).

- *Inhibiteurs de mTOR*

La cible de la rapamycine (mTOR) chez les mammifères est une sérine-thréonine kinase régulant plusieurs processus biologiques impliqués dans la progression tumorale. Ces processus concernent des fonctions cellulaires comme la survie, le métabolisme et la prolifération, la traduction, la biogenèse des ribosomes et l'autophagie [123]. La protéine mTOR appartient à deux complexes distincts, mTORC1 et mTORC2, qui sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation distinctes et exercent des activités différentes sur les protéines situées en aval. L'une de ces voies est la voie PI3K/Akt qui est inhibée par mTORC1 et stimulée par mTORC2 [124]. Les inhibiteurs de mTOR actuellement disponibles sont les analogues de la rapamycine qui bloquent la formation de mTORC1 en s'associant à son récepteur cytosolique FKBP12. Il a été montré cependant que les inhibiteurs de mTOR pouvaient activer Akt *in vivo* et *in vivo*, via mTORC2, ce qui pourrait expliquer les résultats médiocres et très aléatoires obtenus dans certains essais utilisant les inhibiteurs de mTOR [124].

Les résultats de plusieurs études de phase I ayant permis d'obtenir des réponses chez des patients atteints de sarcomes ont démontré l'intérêt de l'inhibition de mTOR dans cette indication. La rapamycine est un macrolide antibiotique initialement utilisé comme fongicide et immunosuppresseur et dont les propriétés antitumorales ont été démontrées plus tardivement. Le développement de la rapamycine et de ses analogues comme agents anticancéreux a donc été le résultat d'observations cliniques et biologiques plutôt que d'un processus de recherche systématique et raisonné. Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs de la rapamycine dans le cadre d'essais cliniques a permis l'acquisition de nouvelles connaissances sur cette voie de signalisation et sur son rôle ambigu dans la progression tumorale [124]. Trois inhibiteurs de mTOR sont en cours de développement clinique : le temsirolimus (CCI-779), l'everolimus (RAD-001) et le deforolimus (AP23573) (Ariad Pharmaceuticals, Los Angeles, California). Le plus développé à ce jour pour le traitement des sarcomes est le deforolimus. Les résultats préliminaires d'une grande étude de phase II utilisant le deforolimus par voie intraveineuse ont été rapportés par Chawla *et al.* au meeting de l'ASCO en 2006 [23]. Ils ont été complétés en 2008 par

une étude pharmacocinétique de phase I utilisant le même produit administré par voie orale [125]. Le premier essai a rapporté un taux de réponse globale de seulement 2,5 % (5/193 patients évaluable) avec cependant un bénéfice clinique notable (RC+RP+SD supérieures à 4 mois selon les critères RECIST) chez 54 patients (28 %), confirmant ainsi (comme avec la trabectedine) l'intérêt limité de la réponse objective au traitement pour évaluer l'efficacité d'une drogue chez les patients porteurs de sarcomes [126]. Un essai de phase III est en cours afin d'évaluer l'utilisation de cette molécule en maintenance chez des patients répondeurs ou stables en première ou troisième ligne de traitement.

Le développement clinique des inhibiteurs de mTOR vise également à prévenir la résistance aux médicaments. L'everolimus, utilisé en association avec l'imatinib, a montré une activité et des résultats prometteurs chez des patients porteurs de GIST résistants, avec une médiane de survie sans progression de 3 mois chez des patients lourdement prétraités [127]. Les résultats définitifs de cet essai ne sont pas encore disponibles.

- *Thérapies ciblant l'angiogenèse*

Plusieurs stratégies thérapeutiques ciblant l'angiogenèse ont été élaborées. La plupart impliquent l'inhibition du VEGF (bevacizumab, VEGF-trap) ou de ses récepteurs (inhibiteurs de tyrosine kinase sunitinib, sorafenib...). La thalidomide également est connue pour son activité antiangiogénique dans les sarcomes gynécologiques ; cependant, son mécanisme d'action reste mal connu et son efficacité limitée [128, 129]. D'autres mécanismes régulateurs de l'angiogenèse ont également été ciblés. Des antagonistes de la thrombospondine, comme l'ABT510, ont été testés, avec des taux de réponse limités mais une proportion importante de stabilité tumorale prolongée. Cependant le traitement a permis une stabilisation prolongée de la maladie chez les patients traités, au-delà des durées généralement rapportées avec des médicaments reconnus comme actifs selon les critères de l'EORTC [130]. Des agents vasculotoxiques sont également en cours de développement dans les sarcomes.

Un traitement combinant le bevacizumab (anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF humain) et la doxorubicine est en cours d'évaluation dans un essai de phase II chez des patients atteints de sarcomes avancés non préalablement traités [131]. L'analyse a montré un taux de réponse objective de seulement 12 %, soit une valeur proche de celles obtenues avec la doxorubicine seule, ainsi qu'une toxicité importante puisque 6 patients sur 17 ont présenté une toxicité cardiaque de grade 2 ou supérieure. Plusieurs essais testant le bevacizumab en combinaison avec d'autres médicaments ciblés comme le sorafenib ou avec des agents cytotoxiques conventionnels comme le docetaxel ou la gemcitabine sont en cours.

Plusieurs petites molécules inhibitrices de la tyrosine kinase sont en cours de développement clinique dans le cadre des sarcomes des tissus mous (STM). Un essai de phase II utilisant un inhibiteur de tyrosine kinase de VEGFR, le pazopanib (GW786034), chez des patients porteurs de STM avancés stratifiés par sous-type histologique (leiomyosarcomes, liposarcomes, sarcomes synoviaux, ou autres) a montré une activité antitumorale notable chez les patients traités, avec une médiane de survie sans progression supérieure à celle obtenue avec des molécules considérées comme actives selon les critères de l'EORTC, des réponses dans les sarcomes syno-

viaux et les leiomyosarcomes, et un taux de survie sans progression supérieur à 40 % dans tous les cas, excepté les liposarcomes. Certains patients sont toujours vivants sans progression de la maladie 24 mois après le début du traitement [132].

Un essai de phase II de sorafenib [25] et de sunitinib [24] chez des patients stratifiés par sous-type histologique a également produit des résultats encourageants. L'activité antitumorale du sorafenib apparaît plus élevée dans les angiosarcomes et les leiomyosarcomes ; sur un total de 147 patients, 5/37 (14 %) angiosarcomes et 2/37 (6 %) leiomyosarcomes ont obtenu une réponse au traitement. La médiane de survie sans progression a été respectivement de 5,2, 5,5 et 2,8 mois chez les patients atteints de leiomyosarcome, d'angiosarcome, ou dans les autres sous-groupes histologiques [25]. Une étude de phase II testant l'administration continue de sunitinib chez des patients porteurs principalement de tumeurs desmoplastiques à petites cellules rondes, de tumeurs à cellules géantes ou d'hémangiopéricytomes et tumeurs fibreuses solitaires a montré une stabilisation de la maladie et une seule réponse au traitement [24] tandis qu'une autre étude a mis en évidence une survie sans progression à 4 mois chez 29/36 patients atteints de leiomyosarcome, de liposarcome ou d'histiocytome fibreux malin [133].

Cette activité antitumorale des antiangiogéniques devra faire l'objet d'essais cliniques plus larges sur des groupes histologiques similaires. Une étude randomisée testant le pazopanib contre un bras « meilleur soins de support » en dernière ligne thérapeutique devrait démarrer prochainement.

#### • *Modulateurs des protéines de stress*

Les protéines de stress, ou protéines heat-shock (HSP) constituent une famille réduite de protéines exprimées par la cellule en situation de stress [26]. La plupart de ces protéines sont exprimées constitutivement et interviennent, dans les conditions normales, dans le pliage et la maturation de nombreuses protéines cellulaires, y compris les récepteurs membranaires et les protéines de signalisation intracellulaire. En situation de stress, leur expression est fortement augmentée. Par leur participation au pliage des protéines, ces molécules, aussi appelées protéines chaperons, sont essentielles à la survie de la cellule [134].

Les protéines chaperons ont un rôle essentiel dans le pliage des protéines nouvellement synthétisées, leur translocation transmembranaire et le renouvellement protéique normal. Elles sont également impliquées dans la régulation post-transcriptionnelle des molécules de signalisation et la présentation des peptides par le système immunitaire [135]. Les fonctions des protéines chaperons sont mises à profit par la cellule cancéreuse pour assurer sa survie malgré un environnement hostile et les nombreuses anomalies génétiques dont elle est porteuse. Deux de ces fonctions pourraient être inhibées par des traitements anticancéreux ciblés qui sont actuellement à l'étude : 1) les protéines de la famille des HSP90, qui semblent jouer un rôle majeur dans la tolérance cellulaire à l'activation des oncogènes, pourraient être ciblées par des inhibiteurs ; 2) les protéines de la famille des HSP70, impliquées dans la présentation des peptides par les cellules présentatrices d'antigènes, pourraient faire l'objet d'un traitement ciblé par des activateurs [136]. Le STA-4783 est une petite molécule qui induit sélectivement l'expression des protéines de stress HSP70. Cet inducteur de stress oxydatif a fait l'objet d'une étude de phase II en deux étapes, en

association avec le paclitaxel. Le traitement comprenait une injection intraveineuse par semaine pendant 3 semaines, suivie d'une semaine de repos. Le recrutement est actuellement terminé. Les résultats obtenus sur les 31 patients de la première étape sont encourageants, 14 d'entre eux (47 %) présentant une stabilisation de la maladie après 4 mois [137].

Plusieurs molécules ciblant les protéines de la famille HSP90 sont également en cours de développement dans les tumeurs solides : la 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycine (17AAG), ainsi que l'IP1504 évoqué plus haut pour le traitement des GIST. Plusieurs essais de phase I testant la 17AAG ont été publiés [138], mais ces études n'ont inclus que très peu de patients atteints de sarcomes.

## Conclusion

Les recherches clinique et biologique sur les sarcomes des tissus mous, les sarcomes viscéraux et les sarcomes osseux sont très actives. Étant donné la rareté de la maladie, il est recommandé d'adresser les patients à des centres spécialisés où ils peuvent être inclus dans des essais cliniques. Grâce aux progrès considérables accomplis en matière de caractérisation biologique de ces tumeurs, ont pu se développer de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant des agents cytotoxiques ciblant spécifiquement certains sous-types histologiques. Ces traitements ont permis des avancées importantes tant pour le contrôle de la maladie que pour la survie des patients. L'évolution constante des techniques de diagnostic moléculaire devrait permettre d'adapter le traitement des GIST à leur statut mutationnel. Actuellement, le traitement des patients prend en compte les mutations éventuelles de KIT et PDGFR. Dans les autres sous-types de sarcomes des tissus mous, la généralisation des techniques de caractérisation moléculaire et la stratification des patients selon leur sous-type histologique telle qu'elle est pratiquée dans les essais cliniques récents devraient déboucher sur une partition des GIST en plusieurs entités distinctes bénéficiant de traitements différents. Dans un futur proche, nous prévoyons l'utilisation généralisée de nouveaux agents thérapeutiques comme l'ET743 et les taxanes qui ont fait preuve d'une grande efficacité en traitement de deuxième ligne associée à une toxicité acceptable pour les patients. Des résultats cliniques prometteurs ont également été obtenus avec certains traitements ciblés comme l'AP23573. ▼

## RÉFÉRENCES

1. Clark MA, Fisher C, Judson I, Thomas JM. Soft-tissue sarcomas in adults. *N Engl J Med* 2005 ; 353 : 701-11.
2. Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer* 2003 ; 3 : 685-94.
3. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 2007 ; 7 : 233-45.
4. Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol* 2004 ; 24 : 7275-83.
5. Bianchini L, Maire G, Pedoutour F. Groupe Francophone de Cytogénétique Oncologique. From cytogenetics to cytogenomics of dermatofibrosarcoma protuberans family of tumors. *Bull Cancer* 2007 ; 94(2) : 179-89.

6. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, *et al.* Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998 ; 279 : 577-80.
7. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, *et al.* PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003 ; 299 : 708-10.
8. Korf BR. Diagnosis and management of neurofibromatosis type 1. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2001 ; 1 : 162-7.
9. Rousseau-Merck MF, Fiette L, Klochendler-Yeivin A, Delattre O, Aurias A. Chromosome mechanisms and INI1 inactivation in human and mouse rhabdoid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2005 ; 157 : 127-33.
10. Sirvent N, Coindre JM, Maire G, Hostein I, Keslair F, Guillou L, *et al.* Detection of MDM2-CDK4 amplification by fluorescence in situ hybridization in 200 paraffin-embedded tumor samples : utility in diagnosing adipocytic lesions and comparison with immunohistochemistry and real-time PCR. *Am J Surg Pathol* 2007 ; 31 : 1476-89.
11. Italiano A, Cardot N, Dupre F, Monticelli I, Keslair F, Piche M, *et al.* Gains and complex rearrangements of the 12q13-15 chromosomal region in ordinary lipomas : the "missing link" between lipomas and liposarcomas? *Int J Cancer* 2007 ; 121 : 308-15.
12. Levy B, Mukherjee T, Hirschhorn K. Molecular cytogenetic analysis of uterine leiomyoma and leiomyosarcoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2000 ; 121 : 1-8.
13. Otano-Joos M, Mechttersheimer G, Ohl S, Wilgenbus KK, Scheurlen W, Lehnert T, *et al.* Detection of chromosomal imbalances in leiomyosarcoma by comparative genomic hybridization and interphase cytogenetics. *Cytogenet Cell Genet* 2000 ; 90 : 86-92.
14. Domont J, Benard J, Lacroix L, Salas S, Dufresne A, Terrier P, *et al.* Detection of [beta]-catenin mutations in primary extra-abdominal fibromatosis (EAF) : An ancillary diagnostic tool. *ASCO Meeting Abstracts* 2008 ; 26 : 10518.
15. Jilong Y, Jian W, Xiaoyan Z, Xiaoqiu L, Xiongzeng Z. Analysis of APC/beta-catenin genes mutations and Wnt signalling pathway in desmoid-type fibromatosis. *Pathology* 2007 ; 39 : 319-25.
16. Blay JY. [Targeted therapies of cancer : not lost in translation]. *Bull Cancer* 2006 ; 93 : 799-804.
17. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, *et al.* Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002 ; 347 : 472-80.
18. Verweij J, Casali PG, Zalcberg J, Lescagne A, Reichardt P, Blay JY, *et al.* Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib : randomised trial. *Lancet* 2004 ; 364 : 1127-34.
19. Blanke CD, Rankin C, Demetri GD, Ryan CW, von Mehren M, Benjamin RS, *et al.* Phase III randomized, intergroup trial assessing imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing the kit receptor tyrosine kinase : S0033. *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 626-32.
20. Olmos D, Okuno S, Schuetz SM, Paccagnella ML, Yin D, Gualberto A, *et al.* Safety, pharmacokinetics and preliminary activity of the anti-IGF-IR antibody CP-751,871 in patients with sarcoma. *ASCO Meeting Abstracts* 2008 ; 26 : 10501.
21. Atzori F, Tabernero J, Cervantes A, Botero M, Hsu K, Brown H, *et al.* A phase I, pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) study of weekly (qW) MK-0646, an insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) monoclonal antibody (MAb) in patients (pts) with advanced solid tumors. *ASCO Meeting Abstracts* 2008 ; 26 : 3519.
22. Ray-Coquard I, Le CA, Whelan JS, Schoffski P, Bui BN, Verweij J, *et al.* A phase II study of gefitinib for patients with advanced HER-1 expressing synovial sarcoma refractory to doxorubicin-containing regimens. *Oncologist* 2008 ; 13 : 467-73.
23. Chawla SP, Tolcher AW, Staddon AP, Schuetz SM, D'Amato GZ, Blay JY, *et al.* Updated results of a phase II trial of AP23573, a novel mTOR inhibitor, in patients (pts) with advanced soft tissue or bone sarcomas. *ASCO Meeting Abstracts* 2006 ; 24 : 9505.
24. Keohan ML, Morgan JA, D'Adamo DR, Harmon D, Butrynski JE, Wagner AJ, *et al.* Continuous daily dosing (CDD) of sunitinib (SU) in patients with metastatic soft tissue sarcomas (STS) other than GIST : Results of a phase II trial. *ASCO Meeting Abstracts* 2008 ; 26 : 10533.
25. Maki RG, Keohan ML, Undevia SD, Livingston M, Cooney MM, Elias A, *et al.* Updated results of a phase II study of oral multi-kinase inhibitor sorafenib in sarcomas, CTEP study #7060. *ASCO Meeting Abstracts* 2008 ; 26 : 10531.
26. Jacquemin-Sablon A. [Hsp90 : how a chaperone becomes a pharmacological target]. *Bull Cancer* 2003 ; 90 : 935-6.
27. Sydor JR, Normant E, Pien CS, Porter JR, Ge J, Grenier L, *et al.* Development of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin hydroquinone hydrochloride (IPI-504), an anti-cancer agent directed against Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 17408-13.
28. Le Cesne A, Perol D, Ray-Coquard I, Bui B, Duffaud F, Rios M, *et al.* Interruption of imatinib (IM) in GIST patients with advanced disease : Updated results of the prospective French Sarcoma Group randomized phase III trial on survival and quality of life. *ASCO Meeting Abstracts* 2005 ; 23 : 9031.
29. Bay JO, Cabrespine A, Gilliot O, *et al.* Docetaxel and gemcitabine combination in soft-tissue sarcomas treatment]. *Bull Cancer* 2007 ; 94 : S122-S126.
30. Maki RG, Wathen JK, Patel SR, Priebe DA, Okuno SH, Samuels B, *et al.* Randomized phase II study of gemcitabine and docetaxel compared with gemcitabine alone in patients with metastatic soft tissue sarcomas : results of sarcoma alliance for research through collaboration study 002 [corrected]. *J Clin Oncol* 2007 ; 25 : 2755-63.
31. Penel N, Bui NB, Bay JO, Cupissol D, Ray-Coquard I, Piperno-Neumann S, *et al.* Weekly paclitaxel in metastatic angiosarcoma. A FNCLCC French Sarcoma Group (GSF-GETO) phase II trial. *ASCO Meeting Abstracts* 2007 ; 25 : 10002.
32. Fata F, O'Reilly E, Ilson D, Pfister D, Leffell D, Kelsen DP, *et al.* Paclitaxel in the treatment of patients with angiosarcoma of the scalp or face. *Cancer* 1999 ; 86 : 2034-7.
33. Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2004 ; 22 : 3813-25.
34. Nilsson B, Bummig P, Meis-Kindblom JM, Oden A, Dortok A, Gustavsson B, *et al.* Gastrointestinal stromal tumors : the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era – a population-based study in western Sweden. *Cancer* 2005 ; 103 : 821-9.
35. Monges G, Coindre J, Scoazec J, Bouvier A, Blay J, Loria-Kanza Y, *et al.* Incidence of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) in France : Results of the PROGIST survey conducted among pathologists. *ASCO Meeting Abstracts* 2007 ; 25 : 10047.
36. Agaimy A, Wunsch PH, Hofstaedter F, Blaszyk H, Rummele P, Gammann A, *et al.* Minute gastric sclerosing stromal tumors (GIST tumorlets) are common in adults and frequently show c-KIT mutations. *Am J Surg Pathol* 2007 ; 31 : 113-20.
37. Blay JY, Bonvalot S, Casali P, Choi H, Biac-Richter M, Dei Tos AP, *et al.* Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors. Report of the GIST Consensus Conference of 20-21 March 2004, under the auspices of ESMO. *Ann Oncol* 2005 ; 16 : 566-78.
38. Blay JY, Landi B, Bonvalot S, Monges G, Ray-Coquard I, Duffaud F, *et al.* [Recommendations for the management of GIST patients]. *Bull Cancer* 2005 ; 92 : 907-18.
39. Demetri GD, Benjamin RS, Blanke CD, Blay JY, Casali P, Choi H, *et al.* NCCN Task Force report : management of patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST)--update of the NCCN clinical practice guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2007 ; 5(Suppl 2) : S1-S29 ; (quiz S30 : S1-29).
40. Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, *et al.* Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors : A consensus approach. *Hum Pathol* 2002 ; 33 : 459-65.

41. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors : pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol* 2006 ; 23 : 70-83.
42. Raut CP, Posner M, Desai J, Morgan JA, George S, Zahrieh D, et al. Surgical management of advanced gastrointestinal stromal tumors after treatment with targeted systemic therapy using kinase inhibitors. *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : 2325-31.
43. Rutkowski P, Nowecki ZI, Michej W, Biec-Rychter M, Limon J, Siedlecki JA, et al. The criteria of aggressiveness and other prognostic factors for predicting relapses of primary tumors and imatinib (IM) treatment outcomes in advanced KIT immunopositive gastrointestinal stromal tumors (GIST) : A report of the Polish Clinical GIST Registry (PCGR). *ASCO Meeting Abstracts* 2006 ; 24 : 9544.
44. Bonvalot S, Eldweny H, Pechoux CL, Vanel D, Terrier P, Cavalcanti A, et al. Impact of surgery on advanced gastrointestinal stromal tumors (GIST) in the imatinib era. *Ann Surg Oncol* 2006 ; 13 : 1596-603.
45. Arifi S, El Sayadi H, Dufresne A, et al. Imatinib and solid tumours. *Bull Cancer* 2008 ; 95(1) : 99-106.
46. Casali PG, Jost L, Reichardt P, Schlemmer M, Blay JY. Gastrointestinal stromal tumors : ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2008 ; 19(Suppl 2) : ii35-ii38.
47. Blay JY, Le CA, Ray-Coquard I, Bui B, Duffaud F, Delbaldo C, et al. Prospective multicentric randomized phase III study of imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors comparing interruption versus continuation of treatment beyond 1 year : the French Sarcoma Group. *J Clin Oncol* 2007 ; 25 : 1107-13.
48. Zalcberg JR, Verweij J, Casali PG, Le CA, Reichardt P, Blay JY, et al. Outcome of patients with advanced gastro-intestinal stromal tumours crossing over to a daily imatinib dose of 800 mg after progression on 400 mg. *Eur J Cancer* 2005 ; 41 : 1751-7.
49. Van Glabbeke MM, Owzar K, Rankin C, Simes J, Crowley J, GIST Meta-analysis Group. Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors (GIST) : A meta-analysis based on 1,640 patients (pts). *ASCO Meeting Abstracts* 2007 ; 25 : 10004.
50. Le Cesne A, Ray-Coquard I, Bui B, Rios M, Adenis A, Bertucci F, et al. Continuous versus interruption of imatinib (IM) in responding patients with advanced GIST after three years of treatment : A prospective randomized phase III trial of the French Sarcoma Group. *ASCO Meeting Abstracts* 2007 ; 25 : 10005.
51. Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, et al. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib : a randomised controlled trial. *Lancet* 2006 ; 368 : 1329-38.
52. Blay JY, Casali PG, Reichardt P, Von Mehren M, Biec-Rychter M, Bailey S, et al. A phase I study of nilotinib alone and in combination with imatinib in patients with imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors (GIST) : Study update. *ASCO Meeting Abstracts* 2008 ; 26 : 10553.
53. Joensuu H, De BF, Coco P, De PT, Putzu C, Spreafico C, et al. Phase II, open-label study of PTK787/ZK222584 for the treatment of metastatic gastrointestinal stromal tumors resistant to imatinib mesylate. *Ann Oncol* 2008 ; 19 : 173-7.
54. Polverino A, Coxon A, Starnes C, Diaz Z, Demelfi T, Wang L, et al. AMG 706, an Oral, Multikinase Inhibitor that Selectively Targets Vascular Endothelial Growth Factor, Platelet-Derived Growth Factor, and Kit Receptors, Potently Inhibits Angiogenesis and Induces Regression in Tumor Xenografts. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 8715-21.
55. Benjamin, R., Schöffski, P., Hartmann, J. T., Bui, B. N., Duyster, J., Schuetze, S. M., Blay, J.-Y., Reichardt, P., Rosen, L. S., Skubitz, K. M., Eschenberg, M., Stepan, D., and Baker, L. Initial results of a multicenter, single-arm phase 2 study of AMG706, an oral multikinase inhibitor, for the treatment of advanced imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Connective Tissue Oncology Society 12<sup>th</sup> Annual Meeting* . 2006. Ref Type : Abstract.
56. Debiec-Rychter M, Cools J, Dumez H, Sciort R, Stul M, Mentens N, et al. Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against imatinib-resistant mutants. *Gastroenterology* 2005 ; 128 : 270-9.
57. Weisberg E, Wright RD, Jiang J, Ray A, Moreno D, Manley PW, et al. Effects of PKC412, Nilotinib, and Imatinib Against GIST-Associated PDG-FRA Mutants With Differential Imatinib Sensitivity. *Gastroenterology* 2006 ; 20 ; (pages?).
58. Reichardt P, Pink D, Lindner T, Heinrich MC, Cohen PS, Wang Y, et al. A phase I/II trial of the oral PKC-inhibitor PKC412 (PKC) in combination with imatinib mesylate (IM) in patients (pts) with gastrointestinal stromal tumor (GIST) refractory to IM. *ASCO Meeting Abstracts* 2005 ; 23 : 3016.
59. Schittenhelm MM, Shiraga S, Schroeder A, Corbin AS, Griffith D, Lee FY, et al. Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 473-81.
60. Morgan JA, Demetri G, Wang D, MacPherson I, LoRusso P, Van Den Abbeele A, et al. A Phase I Study of dasatinib, a Src and multi-kinase inhibitor, in patients (pts) with GIST and other solid tumors. *Eur J Cancer Suppl* 2006 ; 4 : 118.
61. Wiebe L, Kasza KE, Maki RG, D'Adamo RD, Chow WA, Wade JL, et al. Activity of sorafenib (SOR) in patients with imatinib (IM) and sunitinib (SU)-resistant (RES) gastrointestinal stromal tumors (GIST) : A phase II trial of the University of Chicago Phase II Consortium. *ASCO Meeting Abstracts* 2008 ; 26 : 10502.
62. Wagner AJ, Morgan JA, Chugh R, Rosen LS, George S, Gordon MS, et al. Inhibition of heat shock protein 90 (Hsp90) with the novel agent IPI-504 in metastatic GIST following failure of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) or other sarcomas : Clinical results from a phase I trial. *ASCO Meeting Abstracts* 2008 ; 26 : 10503.
63. Dematteo RP, Owzar K, Maki R, Pisters P, Blackstein M, Antonescu C, et al. Adjuvant imatinib mesylate increases recurrence free survival (RFS) in patients with completely resected localized primary gastrointestinal stromal tumor (GIST) : North American Intergroup Phase III trial ACOSOG Z9001. *ASCO Meeting Abstracts* 2007 ; 25 : 10079.
64. Casali PG, Jost L, Sleijfer S, Verweij J, Blay JY. Soft tissue sarcomas : ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2008 ; 19(Suppl 2) : ii89-ii93.
65. Yang JC, Chang AE, Baker AR, Sindelar WF, Danforth DN, Topalian SL, et al. Randomized prospective study of the benefit of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcomas of the extremity. *J Clin Oncol* 1998 ; 16 : 197-203.
66. Pisters PW, Harrison LB, Leung DH, Woodruff JM, Casper ES, Brennan MF. Long-term results of a prospective randomized trial of adjuvant brachytherapy in soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol* 1996 ; 14 : 859-68.
67. Stewart LA, Parmar MKB, Fletcher CDM, Jones G, Mosseri V, Patel M, et al. Adjuvant chemotherapy for localised resectable soft-tissue sarcoma of adults : meta-analysis of individual data. *Sarcoma Meta-analysis Collaboration*. *Lancet* 1997 ; 350 : 1647-54.
68. Frustaci S, Gherlinzoni F, De PA, Bonetti M, Azzarelli A, Comandone A, et al. Adjuvant chemotherapy for adult soft tissue sarcomas of the extremities and girdles : results of the Italian randomized cooperative trial. *J Clin Oncol* 2001 ; 19 : 1238-47.
69. Woll PJ, Van GM, Hohenberger P, Le CA, Gronchi A, Hoekstra HJ, et al. Adjuvant chemotherapy (CT) with doxorubicin and ifosfamide in resected soft tissue sarcoma (STS) : Interim analysis of a randomised phase III trial. *ASCO Meeting Abstracts* 2007 ; 25 : 10008.
70. Antman K, Crowley J, Balcerzak SP, Rivkin SE, Weiss GR, Elias A, et al. An intergroup phase III randomized study of doxorubicin and dacarbazine with or without ifosfamide and mesna in advanced soft tissue and bone sarcomas. *J Clin Oncol* 1993 ; 11 : 1276-85.



71. Edmonson JH, Ryan LM, Blum RH, Brooks JS, Shiraki M, Frytak S, *et al.* Randomized comparison of doxorubicin alone versus ifosfamide plus doxorubicin or mitomycin, doxorubicin, and cisplatin against advanced soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol* 1993 ; 11 : 1269-75.
72. Santoro A, Tursz T, Mouridsen H, Verweij J, Steward W, Somers R, *et al.* Doxorubicin versus CYVADIC versus doxorubicin plus ifosfamide in first-line treatment of advanced soft tissue sarcomas : a randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *J Clin Oncol* 1995 ; 13 : 1537-45.
73. Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Oosterhuis JW, Mouridsen H, Crowther D, Somers R, *et al.* Prognostic factors for the outcome of chemotherapy in advanced soft tissue sarcoma : an analysis of 2,185 patients treated with anthracycline-containing first-line regimens--a European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Study. *J Clin Oncol* 1999 ; 17 : 150-7.
74. Rydholm A. Improving the management of soft tissue sarcoma. Diagnosis and treatment should be given in specialist centres. *BMJ* 1998 ; 317 : 93-4.
75. Ray-Coquard I, Thiesse P, Ranchere-Vince D, Chauvin F, Bobin JY, Sunyach MP, *et al.* Conformity to clinical practice guidelines, multidisciplinary management and outcome of treatment for soft tissue sarcomas. *Ann Oncol* 2004 ; 15 : 307-15.
76. Pellegrini F, Budman DR. Review : tubulin function, action of antitubulin drugs, and new drug development. *Cancer Invest* 2005 ; 23 : 264-73.
77. Van Hoesel QG, Verweij J, Catimel G, Clavel M, Kerbrat P, van Oosterom AT, *et al.* Phase II study with docetaxel (Taxotere) in advanced soft tissue sarcomas of the adult. EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Ann Oncol* 1994 ; 5 : 539-42.
78. Edmonson JH, Ebbert LP, Nascimento AG, Jung SH, McGaw H, Gershtner JB. Phase II study of docetaxel in advanced soft tissue sarcomas. *Am J Clin Oncol* 1996 ; 19 : 574-6.
79. Svancarova L, Blay JY, Judson IR, van Hoesel QG, van Oosterom AT, Le CA, *et al.* Gemcitabine in advanced adult soft-tissue sarcomas. A phase II study of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer* 2002 ; 38 : 556-9.
80. Duffaud F, Bui BN, Penel N, Cioffi A, Isambert N, Blay JY, *et al.* A FNCLCC French Sarcoma Group--GETO multicenter randomized phase II study of gemcitabine (G) versus gemcitabine and docetaxel (G+D) in patients with metastatic or relapsed leiomyosarcoma (LMS). *ASCO Meeting Abstracts* 2008 ; 26 : 10511.
81. Fata F, O'Reilly E, Ilson D, Pfister D, Leffell D, Kelsen DP, *et al.* Paclitaxel in the treatment of patients with angiosarcoma of the scalp or face. *Cancer* 1999 ; 86 : 2034-7.
82. Skubitz KM, Haddad PA. Paclitaxel and pegylated-liposomal doxorubicin are both active in angiosarcoma. *Cancer* 2005 ; 104 : 361-6.
83. Delaloge S, Yovine A, Taamma A, Riofrio M, Brain E, Raymond E, *et al.* Ecteinascidin-743 : a marine-derived compound in advanced, pretreated sarcoma patients--preliminary evidence of activity. *J Clin Oncol* 2001 ; 19 : 1248-55.
84. Garcia-Carbonero R, Supko JG, Manola J, Seiden MV, Harmon D, Ryan DP, *et al.* Phase II and pharmacokinetic study of ecteinascidin 743 in patients with progressive sarcomas of soft tissues refractory to chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004 ; 22 : 1480-90.
85. Garcia-Carbonero R, Supko JG, Maki RG, Manola J, Ryan DP, Harmon D, *et al.* Ecteinascidin-743 (ET-743) for chemotherapy-naïve patients with advanced soft tissue sarcomas : multicenter phase II and pharmacokinetic study. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 5484-92.
86. Le Cesne A, Blay JY, Judson I, Van OA, Verweij J, Radford J, *et al.* Phase II study of ET-743 in advanced soft tissue sarcomas : a European Organisation for the Research and Treatment of Cancer (EORTC) soft tissue and bone sarcoma group trial. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 576-84.
87. Yovine A, Riofrio M, Blay JY, Brain E, Alexandre J, Kahatt C, *et al.* Phase II study of ecteinascidin-743 in advanced pretreated soft tissue sarcoma patients. *J Clin Oncol* 2004 ; 22 : 890-9.
88. Samuels BL, Rushing D, Chawla SP, Schuetze SM, Von Mehren M, Keohan ML, *et al.* Randomized phase II study of trabectedin (ET-743) given by two different dosing schedules in patients (pts) with leiomyosarcomas (LMS) or liposarcomas (LPS) refractory to conventional doxorubicin and ifosfamide chemotherapy. *ASCO Meeting Abstracts* 2004 ; 22 : 9000.
89. Ryan DP, Puchalski T, Supko JG, Harmon D, Maki R, Garcia-Carbonero R, *et al.* A phase II and pharmacokinetic study of ecteinascidin 743 in patients with gastrointestinal stromal tumors. *Oncologist* 2002 ; 7 : 531-8.
90. Blay JY, Le CA, Verweij J, Scurr M, Seynaeve C, Bonvalot S, *et al.* A phase II study of ET-743/trabectedin ('Yondelis') for patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Cancer* 2004 ; 40 : 1327-31.
91. Grosso F, Jones RL, Demetri GD, Judson IR, Blay JY, Le CA, *et al.* Efficacy of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced pretreated myxoid liposarcomas : a retrospective study. *Lancet Oncol* 2007 ; 8 : 595-602.
92. Leahy M, Ray-Coquard I, Verweij J, Cesne AL, Duffaud F, Hogendoorn PC, *et al.* Brostallicin, an agent with potential activity in metastatic soft tissue sarcoma : A phase II study from the EORTC soft tissue and bone sarcoma group. *Eur J Cancer* 2006.
93. Blay JY, Le CA, Alberti L, Ray-Coquard I. Targeted cancer therapies. *Bull Cancer* 2005 ; 92 : E13-E18.
94. Maki RG, Awan RA, Dixon RH, Jhanwar S, Antonescu CR. Differential sensitivity to imatinib of 2 patients with metastatic sarcoma arising from dermatofibrosarcoma protuberans. *Int J Cancer* 2002 ; 100 : 623-6.
95. West RB, Rubin BP, Miller MA, Subramanian S, Kaygusuz G, Montgomery K, *et al.* A landscape effect in tenosynovial giant-cell tumor from activation of CSF1 expression by a translocation in a minority of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 690-5.
96. Cupp JS, Miller MA, Montgomery KD, Nielsen TO, O'Connell JX, Huntsman D, *et al.* Translocation and expression of CSF1 in pigmented villonodular synovitis, tenosynovial giant cell tumor, rheumatoid arthritis and other reactive synovitides. *Am J Surg Pathol* 2007 ; 31 : 970-6.
97. Dewar AL, Cambareri AC, Zannettino AC, Miller BL, Doherty KV, Hughes TP, *et al.* Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib. *Blood* 2005 ; 105 : 3127-32.
98. Blay JY, El SH, Thiesse P, Garret J, Ray-Coquard I. Complete response to imatinib in relapsing pigmented villonodular synovitis/tenosynovial giant cell tumor (PVNS/TGCT). *Ann Oncol* 2008 ; 19 : 821-2.
99. Nagayama S, Katagiri T, Tsunoda T, Hosaka T, Nakashima Y, Araki N, *et al.* Genome-wide analysis of gene expression in synovial sarcomas using a cDNA microarray. *Cancer Res* 2002 ; 62 : 5859-66.
100. Albritton KH, Rankin C, Coffin CM, Ratner N, Budd GT, Schuetze SM, *et al.* Phase II study of erlotinib in metastatic or unresectable malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST). *ASCO Meeting Abstracts* 2006 ; 24 : 9518.
101. Nuciforo PG, Pellegrini C, Fasani R, Maggioni M, Coggi G, Parafioriti A, *et al.* Molecular and immunohistochemical analysis of HER2/neu oncogene in synovial sarcoma. *Hum Pathol* 2003 ; 34 : 639-45.
102. Bodner K, Bodner-Adler B, Kimberger O, Czerwenka K, Leodolter S, Mayerhofer K. Estrogen and progesterone receptor expression in patients with uterine leiomyosarcoma and correlation with different clinicopathological parameters. *Anticancer Res* 2003 ; 23 : 729-32.
103. Kelley TW, Borden EC, Goldblum JR. Estrogen and progesterone receptor expression in uterine and extrauterine leiomyosarcomas : an immunohistochemical study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004 ; 12 : 338-41.
104. Leitao MM, Soslow RA, Nonaka D, Olshen AB, Aghajanian C, Sabbatini P, *et al.* Tissue microarray immunohistochemical expression of estrogen, progesterone, and androgen receptors in uterine leiomyomata and leiomyosarcoma. *Cancer* 2004 ; 101 : 1455-62.
105. Micci F, Walter CU, Teixeira MR, Panagopoulos I, Bjerkehagen B, Saeeter G, *et al.* Cytogenetic and molecular genetic analyses of endometrial stromal sarcoma : nonrandom involvement of chromosome arms 6p and 7p and confirmation of JAZF1/JJAZ1 gene fusion in t(7 ; 17). *Cancer Genet Cytogenet* 2003 ; 144 : 119-24.

106. Pink D, Lindner T, Mrozek A, Kretschmar A, Thuss-Patience PC, Dorken B, et al. Harm or benefit of hormonal treatment in metastatic low-grade endometrial stromal sarcoma : single center experience with 10 cases and review of the literature. *Gynecol Oncol* 2006 ; 101 : 464-9.
107. Fayette J, Ray-Coquard I, Bompas E, Zufferey L, Tabone-Eglinger S, Ranchere D, et al. Aromatase inhibitors (AI) are highly effective in uterine sarcomas (US) expressing estrogen receptors. *ASCO Meeting Abstracts* 2006 ; 24 : 9576.
108. Soni R, Muller L, Furet P, Schoepfer J, Stephan C, Zumstein-Mecker S, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) by fascaplysin, a marine natural product. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 ; 275 : 877-84.
109. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004 ; 303 : 844-8.
110. Mariani O, Brennetot C, Coindre JM, Gruel N, Ganem C, Delattre O, et al. JUN oncogene amplification and overexpression block adipocytic differentiation in highly aggressive sarcomas. *Cancer Cell* 2007 ; 11 : 361-74.
111. Thomas D, Chawla SP, Skubitzy K, Staddon AP, Henshaw R, Blay JY, et al. Denosumab treatment of giant cell tumor of bone : Interim analysis of an open-label phase II study. *ASCO Meeting Abstracts* 2008 ; 26 : 10500.
112. Phillips SR, A'Hern R, Thomas JM. Aggressive fibromatosis of the abdominal wall, limbs and limb girdles. *Br J Surg* 2004 ; 91 : 1624-9.
113. Merchant NB, Lewis JJ, Woodruff JM, Leung DH, Brennan MF. Extremity and trunk desmoid tumors : a multifactorial analysis of outcome. *Cancer* 1999 ; 86 : 2045-52.
114. Posner MC, Shiu MH, Newsome JL, Hajdu SI, Gaynor JJ, Brennan MF. The desmoid tumor. Not a benign disease. *Arch Surg* 1989 ; 124 : 191-6.
115. Lanari A. Effect of progesterone on desmoid tumors (aggressive fibromatosis). *N Engl J Med* 1983 ; 309 : 1523.
116. Sorensen A, Keller J, Nielsen OS, Jensen OM. Treatment of aggressive fibromatosis : a retrospective study of 72 patients followed for 1-27 years. *Acta Orthop Scand* 2002 ; 73 : 213-9.
117. Janinis J, Patriki M, Vini L, Aravantinos G, Whelan JS. The pharmacological treatment of aggressive fibromatosis : a systematic review. *Ann Oncol* 2003 ; 14 : 181-90.
118. Bonvalot S, Eldweny H, Haddad V, Rimareix F, Missenard G, Oberlin O, et al. Extra-abdominal primary fibromatosis : Aggressive management could be avoided in a subgroup of patients. *Eur J Surg Oncol* 2008 ; 34 : 462-8.
119. Deyrup AT, Tretiakova M, Montag AG. Estrogen receptor-beta expression in extraabdominal fibromatoses : an analysis of 40 cases. *Cancer* 2006 ; 106 : 208-13.
120. Heinrich MC, McArthur GA, Demetri GD, Joensuu H, Bono P, Herrmann R, et al. Clinical and molecular studies of the effect of imatinib on advanced aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : 1195-203.
121. Penel N, Le Cesne A, Bui B, Tubiana-Hulin M, Guillemet C, Cupissol D, et al. Imatinib for the treatment of aggressive fibromatosis (desmoid tumors) failing local treatment. A phase II trial of the French Sarcoma Group. *ASCO Meeting Abstracts* 2006 ; 24 : 9516.
122. Casali PG, Stacchiotti S, Sangalli C, Olmi P, Gronchi A. Chordoma. *Curr Opin Oncol* 2007 ; 19 : 367-70.
123. Cortot A, Armand JP, Soria JC. [PI3K-AKT-mTOR pathway inhibitors]. *Bull Cancer* 2006 ; 93 : 19-26.
124. Sabatini DM. mTOR and cancer : insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 2006 ; 6 : 729-34.
125. Mita MM, Britten CD, Poplin E, Tap WD, Carmona A, Yonemoto L, et al. Deforolimus trial 106- A Phase I trial evaluating 7 regimens of oral Deforolimus (AP23573, MK-8669). *ASCO Meeting Abstracts* 2008 ; 26 : 3509.
126. Van Glabbeke M, Verweij J, Judson I, Nielsen OS. Progression-free rate as the principal end-point for phase II trials in soft-tissue sarcomas. *Eur J Cancer* 2002 ; 38 : 543-9.
127. van Oosterom A, Reichardt P, Blay JY, Dumez H, Fletcher J, Bierychtyer M, et al. A phase I/II trial of the oral mTOR-inhibitor everolimus (E) and imatinib mesylate (IM) in patients (pts) with gastrointestinal stromal tumor (GIST) refractory to IM : Study update. *ASCO Meeting Abstracts* 2005 ; 23 : 9033.
128. Kumar S, Witzig TE, Rajkumar SV. Thalidomid : current role in hte treatment of non-plasma cell malignancies. *J Clin Oncol* 2004 ; 22 : 2477-88.
129. Yi-Shin KD, Timmins P, Blank SV, Fields AL, Goldberg GL, Murgo A, et al. Phase II trial of thalidomide for advanced and recurrent gynecologic sarcoma : a brief communication from the New York Phase II consortium. *Gynecol Oncol* 2006 ; 100 : 160-5.
130. Baker LH, Demetri GD, Mendelson DS, Rowinsky EK, McKeegan EM, Knight RA, et al. A randomized phase 2 study of the thrombospondin-mimetic peptide ABT-510 in patients with advanced soft tissue sarcoma (STS). *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 9013 ; (Meeting Abstracts).
131. D'Adamo DR, Anderson SE, Albritton K, Yamada J, Riedel E, Scheu K, et al. Phase II study of doxorubicin and bevacizumab for patients with metastatic soft-tissue sarcomas. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 7135-42.
132. Sleijfer S, Ouali M, Van Glabbeke M, Krarup-Hansen A, Leahy MG, Rodenhuis S, et al. Prognostic and predictive factors for outcome to first-line ifosfamide-containing therapy (IFM) in patients (pts) with advanced soft tissue sarcomas (STS) treated in EORTC-STBSG studies. *ASCO Meeting Abstracts* 2008 ; 26 : 10509.
133. Vigil CE, Chiappori AA, Williams CA, Shrager HH, Murray BL, Letson DG, et al. Phase II study of sunitinib malate (SM) in subjects with metastatic and/or surgically unresectable non-GIST soft tissue sarcomas. *ASCO Meeting Abstracts* 2008 ; 26 : 10535.
134. Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 2005 ; 5 : 761-72.
135. Calderwood SK, Theriault JR, Gong J. Message in a bottle : role of the 70-kDa heat shock protein family in anti-tumor immunity. *Eur J Immunol* 2005 ; 35 : 2518-27.
136. Gehrmann M. Drug evaluation : STA-4783--enhancing taxane efficacy by induction of Hsp70. *Curr Opin Investig Drugs* 2006 ; 7 : 574-80.
137. Sherman ML, Ryan C, Blackstein M, Mendelson D, Agarwala S, Dooley W, et al. Phase 1/2 study of STA-4783, a novel heat shock protein 70 (hsp70) inducer, in combination with paclitaxel in patients with soft tissue sarcomas (STS). *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 9069 ; (Meeting Abstracts).
138. Ramanathan RK, Trump DL, Eiseman JL, Belani CP, Agarwala SS, Zuhowski EG, et al. Phase I pharmacokinetic-pharmacodynamic study of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17AAG, NSC 330507), a novel inhibitor of heat shock protein 90, in patients with refractory advanced cancers. *Clin Cancer Res* 2005 ; 11 : 3385-91.

# Expert Opinion

1. Introduction
2. Phase I trials and pharmacology
3. Clinical development of imatinib mesilate in patients with GISTs
4. KIT/PDGFR mutations and sensitivity to imatinib mesilate
5. Imatinib in the adjuvant setting
6. Expert opinion

**informa**  
healthcare

## Imatinib mesilate for the treatment of gastrointestinal stromal tumour

Philippe A Cassier, Armelle Dufresne, Samia Arifi, Hiba El Sayadi, Intidar Labidi, Isabelle Ray-Coquard, Séverine Tabone, Pierre Mééus, Dominique Ranchère, Marie-Pierre Sunyach, Anne-Valérie Decouvelaere, Laurent Alberti & Jean-Yves Blay<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Unité de Jour d'Oncologie Médicale Multidisciplinaire, Pavillon E, Hôpital Edouard Herriot, 5 place d'Arsonval, 69003 Lyon, France

**Background:** The molecular hallmark of gastrointestinal stromal tumours (GISTs), the mutation of the *KIT* gene, was discovered 10 years ago. GISTs have since been recognized as separate pathological entities among sarcomas, and have become a model for targeted treatment of solid tumours. Imatinib mesilate, which was approved in 2002 for the treatment of patients with advanced GIST, has dramatically changed the course of the disease. **Objective:** This article will focus on the development of imatinib mesilate in the treatment of patients with GIST. **Methods:** A Pubmed search was performed using the keywords 'imatinib', 'gastrointestinal stromal', 'GIST', 'KIT' and 'PDGFR'. Websites of the American Society of Clinical Oncology and the European Society of Medical Oncology were searched for data reported in abstract form at recent symposiums. Personal communications from opinion leaders were sought for additional information that might be relevant. **Results:** Imatinib has changed the clinical course of patients with advanced GISTs and further development in the adjuvant setting as well as prospective assessment of predictive factors are the current focus of ongoing research.

**Keywords:** adjuvant therapy, gastrointestinal stromal tumour, GIST, imatinib, management, surgery

*Expert Opin. Pharmacother.* (2008) 9(7):1-12

### 1. Introduction

#### 1.1 Epidemiology

Gastrointestinal stromal tumours (GISTs) are the most common mesenchymal tumours of the gastrointestinal tract. Their incidence is estimated to be in the range of 10 – 15 cases per 1,000,000 [1-3]. However, the true incidence of GISTs is unknown and retrospective studies performed on pathological specimens show an unexpectedly high incidence of small size GISTs (termed microGISTs). Clinically meaningful GISTs, however, are rare, although not as rare as previously thought. The median age at diagnosis is 60 – 65 years [1,2,4]. These tumours may arise anywhere in the gastrointestinal tract but most tumours are found in the stomach (39 – 65%), the small intestine (21 – 43%) and the colon and rectum (2 – 15%). In addition, it is estimated that 5 – 10% of GISTs may arise in the mesentery or pelvis [1,2,4,5].

#### 1.2 Clinical presentation

At diagnosis, the majority of patients with GISTs report non-specific symptoms of abdominal tumours such as abdominal discomfort, bowel obstruction,

55 gastrointestinal bleeding or fatigue; a significant proportion  
of GISTs (12 – 19%) are diagnosed incidentally during  
endoscopy, surgery or physical examination [6-8]. Up to 40%  
of cases may be diagnosed in the context of an emergency  
60 complication (bleeding, perforation, occlusion) [6,7,9].

### 1.3 Molecular biology

Approximately 95% of GISTs stain positive for the CD117  
antigen on immunohistochemistry. The KIT protein is the  
cell-surface trans-membrane tyrosine kinase receptor of the  
65 stem cell factor [1,10]. In 1998, Hirota *et al.* [11] identified  
activation mutations of the *KIT* gene in familial and  
sporadic cases of GISTs; these mutations were later found in  
the majority of sporadic GISTs [12]: 80 – 85% of GISTs  
exhibit activating *KIT* mutations [10,13]. Beside *KIT* exon 11  
70 mutations, other mutations were identified, affecting the  
extracellular part of the juxta-membrane domain (exon 9),  
and more rarely the kinase 1 (exon 13) and 2 (exon 17)  
domains in patients with GISTs [13-16]. *KIT* mutations were  
found in very small (< 1 cm), incidentally discovered GISTs,  
75 which is an argument for an early oncogenic role in the  
progression of these tumours [17]. The remaining tumours  
(10 – 15%) either exhibit an activating mutation of the  
platelet derived growth factor receptor  $\alpha$  (*PDGFRA*)  
gene, which was first reported in 2003 by Heinrich and  
80 collaborators [18] in 5 – 7% of patients [19], or show no  
mutations of these two genes; this latter subgroup is  
generally referred to as 'wild type' GIST. *PDGFRA*  
mutations, which primarily affect exons 12 and 18, are  
mutually exclusive to *KIT* mutations. *PDGFRA* mutations  
85 are most often found in gastric tumours and are associated  
with a more indolent clinical course [20,21]. The impact of  
*KIT* mutations on prognosis is less clear and several teams  
have reported conflicting results [22,23]. Of note, data from  
two recently published autopsy series suggest that the  
90 incidence of GISTs may be much higher than previously  
reported, and as high as 35%, with 8 – 50% of cases  
exhibiting the canonical mutations observed in larger  
tumours [24,25]. Although it is now widely admitted that all  
GISTs are potentially malignant, these observations suggest  
95 that additional molecular events are needed for a GIST  
to become a tumour with metastatic potential [24,25].

### 1.4 Management of patients with GISTs

100 Diagnosis of GISTs is generally made during surgery, often  
in the context of an emergency procedure. A histological  
sample may be obtained prior to surgery using endoscopic  
techniques. When no histological sample can be obtained,  
in particular in cases of small submucosal tumours  
not accessible using endoscopic biopsies, the role of *trans*-  
105 abdominal biopsy prior to definitive surgery is debated;  
in these cases, the potential risk of tumour spread during  
the procedure must be balanced against that of performing  
an unjustified mutilating surgical procedure (i.e., for a  
109 benign tumour or for an abdominal tumour that may not

require such a procedure, such as lymphomas or germ 110  
cell tumours). A careful multidisciplinary assessment of the  
local presentation of the tumour is therefore necessary, and  
should include, in addition to a computed tomography  
(CT) scan, echoendoscopy or MRI in specific sites such  
as the rectum [26]. 115

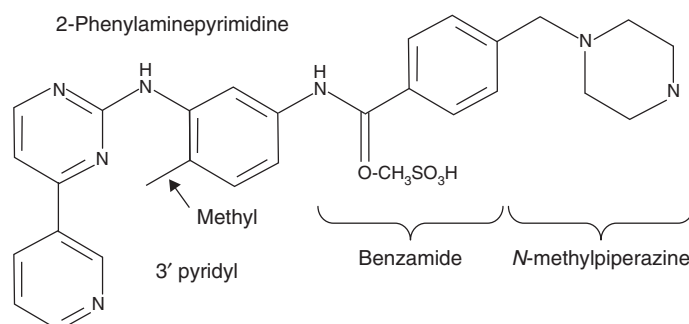
Once diagnosed, the curative treatment of a primary  
GIST is based on the surgical excision of the tumour.  
The aim of the procedure is to achieve complete *en bloc*  
resection of the lesion, with clear R0 margins, and to avoid  
tumour rupture or spillage. Recurrence following surgery 120  
has been reported in 11 – 56% of patients in previous  
retrospective series [4,27,28]. The risk of recurrence following  
adequate surgical resection depends on histological features  
(mitotic index), tumour size, and location [7,28]. According  
to the National Institutes of Health (NIH) consensus, GISTs 125  
can be classified as very low, low, intermediate and high  
risk based on the primary tumour size and the mitotic  
rate expressed per 50 high power fields (HPF) [29].  
Miettinen *et al.* [7] recently suggested a more refined classi-  
fication based on the same indicators (size and mitotic 130  
activity) but using more subclasses in relation to the primary  
tumour location. This classification allows the identification  
of tumours with > 20% risk of relapse, such as tumours  
of the duodenum larger than 5 cm, or tumours with a  
mitotic activity > 5/50 HPF, while large gastric tumours 135  
(including tumours over 10 cm) with low mitotic index  
( $\leq$  5/50 HPF) are now considered to be associated with  
a low risk of relapse ( $\leq$  10%) [6,7,9,30].

GISTs recur in the abdominal cavity or as liver metastasis,  
rarely in the lung (rectal GIST), or bones. Before imatinib 140  
mesilate (Gleevec®/Glivec®, Novartis), the prognosis for  
patients with recurrent or metastatic GIST was very poor,  
with a median overall survival ranging from 9 to 18 months  
in most series. The chance of cure in this setting was  
extremely low, even after complete surgical removal of the 145  
lesions [4]. GISTs are otherwise chemo- and radio-resistant  
tumours. The introduction of imatinib mesilate has drama-  
tically changed the natural history of recurrent or metastatic  
GISTs, and this drug has now become the standard of  
care in the treatment of patients with advanced tumours. 150  
In the following sections, we will discuss the development  
of this drug for treating GISTs.

## 2. Phase I trials and pharmacology

### 2.1 Pharmacodynamics

Imatinib mesilate is a small molecule tyrosine kinase inhibitor  
initially developed to target the Bcr-Abl fusion protein  
for the treatment of chronic myelogenous leukaemia  
(CML) [31]. Due to structural similarities between tyrosine  
160 kinases, imatinib mesilate is not only a potent inhibitor of  
Abl and Bcr-Abl but can also block the kinase activity of  
KIT, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , Abl-related gene (*ARG*) [32] and  
FMS (receptor for colony stimulating factor 1) [33]. Imatinib 164



**Figure 1. Chemical structure of imatinib mesilate.**

165 mesilate, a 2-phenylaminopyrimidine derivative (Figure 1),  
 166 was shown to inhibit PDGFR $\alpha$  [34] and KIT [35]  
 167 signalling *in vitro*, including the oncogenic variant of  
 168 KIT in a cell line derived from a patient with GIST [36].  
 169 These preclinical data provided the rationale for the use  
 170 of imatinib mesilate in the treatment of patients with  
 171 advanced GIST.

## 2.2 Pharmacokinetics

172 Imatinib mesilate is orally administered and well absorbed,  
 173 with a 98% bioavailability. The maximum concentration  
 174 was reached approximately 3 – 4 h after oral administration  
 175 in Phase I trials of imatinib mesilate for both CML  
 176 and solid tumours, in both adults and children. Imatinib  
 177 mesilate is metabolised by the cytochrome P450 (CYP)  
 178 isoforms CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, and  
 179 CYP3A5 [37]. The terminal half-life of imatinib in plasma  
 180 ranged from 8 to 16 h in these studies [38-40] after a single  
 181 dose administration. The half-life appeared longer after the  
 182 steady state was reached and was clearly decreased by  
 183 enzyme-inducing (i.e., CYP3A4-inducing) antiepileptic  
 184 drugs in a Phase I/II trial in patients with glioma [40]. Data  
 185 from a pharmacologic study examining the administration  
 186 of ketoconazole (a CYP3A4 inhibitor) and imatinib mesilate  
 187 indicated a major interaction, with drugs interacting  
 188 with CYP3A4 enzymes [41]. In this single-dose study, healthy  
 189 volunteers first received a single dose of imatinib mesilate  
 190 200 mg followed by serial blood sampling for pharmaco-  
 191 kinetic analysis; then, after a minimum period of 7 days  
 192 washout time, they received imatinib mesilate 200 mg  
 193 and ketoconazole 200 or 400 mg followed, once again, by  
 194 serial blood sampling. Administration of ketoconazole with  
 195 imatinib mesilate significantly increased the maximum  
 196 concentration and area under the curve of imatinib  
 197 mesilate and significantly decreased the clearance of  
 198 the drug. Another study, in which imatinib mesilate was  
 199 administered with simvastatin, showed that imatinib  
 200 mesilate could competitively inhibit the metabolism of  
 201 simvastatin, which relies on CYP3A4 activity [42].  
 202  
 203

## 2.3 Phase I trials

204 The first patient with advanced GIST treated with imatinib  
 205 mesilate was reported by Joensuu *et al.* [43] in the  
 206 *New England Journal of Medicine* in 2001. The specta-  
 207 cular results seen in this first patient prompted the  
 208 development of imatinib mesilate in this setting.  
 209 Van Oosterom *et al.* [44] reported on a Phase I trial in  
 210 36 patients with advanced GISTs and four patients  
 211 with advanced non-GIST sarcomas [44]. In this study,  
 212 patients were given 400 mg once daily, 300 mg twice  
 213 daily, 400 mg twice daily or 500 mg twice daily. The  
 214 main side effects were skin rash, oedema, nausea and  
 215 vomiting and diarrhoea. As for leukaemia patients, side  
 216 effects were in most cases mild and 11 patients required  
 217 dose reduction because of mild myelosuppression or  
 218 gastrointestinal side effects, six of them in the 500 mg  
 219 twice daily cohort and none in the 400 mg per day cohort.  
 220 Other significant side effects are detailed in the following  
 221 section and in Table 1. Partial responses were reported  
 222 in 19 of 36 patients (53%).

223 Recently, the National Cancer Institute Organ  
 224 Dysfunction Working Group (NCI-ODWG) reported two  
 225 Phase I trials in patients with impaired renal function and  
 226 impaired liver function. Surprisingly, these studies showed  
 227 that plasma pharmacokinetics were not altered by liver  
 228 dysfunction [45] and were only moderately modified by  
 229 renal dysfunction [46] with no impact seen on toxicity.  
 230 Based on their results, the authors recommend that  
 231 patients with mild (total bilirubin less than  $1.5 \times$  the  
 232 upper limit of normal [ULN]) to severe liver dysfunction  
 233 (total bilirubin =  $3 - 10 \times$  ULN) as well as patients with  
 234 mild (creatinine clearance =  $40 - 59$  ml/min) or moderate  
 235 (creatinine clearance =  $20 - 39$  ml/min) renal dysfunction  
 236 be treated with the standard dose of imatinib mesilate  
 237 (i.e., 400 mg per day), while patients with severe renal  
 238 dysfunction should be treated with lower doses and closely  
 239 monitored for toxicity. Finally, patients with impaired liver  
 240 function should be closely monitored, as imatinib mesilate  
 241 may further alter liver function [47].  
 242

**Table 1. Main toxicities reported in trials of imatinib mesylate in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours (GISTs).**

Study	n	Imatinib mesylate dose (mg)	Oedema (%)	Nausea (%)	Diarrhoea (%)	Myalgia (%)	Fatigue (%)	Skin rash (%)
EORTC Phase I [43]	40	400 – 1000	25.00	10.0				12.5
US/Finland B2222 Phase II [48,50]	73	400	71.2	50.7	39.7	37.0	30.1	24.7
	74	600	77.0	54.1	50.0	41.9	39.2	36.5
EORTC Phase II [52]	40	800	84.0	57.0	47.0		76.0	69.0
EORTC Phase III [53]	470	400	71.3	48.7	48.1	24.5	67.9	26.6
	472	800	87.3	60.6	56.8	27.8	79.2	46.6
Intergroup S0033 Phase III [57]	373	400	Only grade 3 – 5 toxicities reported. In most cases higher incidence in the high-dose arm (800 mg per day)					
	373	800						

Numbers represent all grades (1 – 4). Grade 3 – 4 toxicities were less than 10% in all trials except in the S0033 study where grade  $\geq$  3 anaemia, cardiac and gastrointestinal events occurred in 14, 14 and 16% of the patients, respectively.

**Table 2. Main efficacy results of imatinib mesylate in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours (GISTs).**

Study	n	Imatinib mesylate dose (mg)	RR (%)	SD (%)	2-year PFS
EORTC Phase I [43]	36	400 – 1000	56	36	NR
US B2222 Phase II [48,50]	73	400	49.3 (68.5%)	31.5 (13.7)	70 (1-year PFS)
	74	600	58.1 (64.9)	24.3 (17.6)	
EORTC Phase II [52]	27	800	70	18	73 (1-year PFS)
EORTC Phase III [53]	473	400	50	32	44
	473	800	51	31	52
Intergroup S0033 Phase III [57]	345	400	45	25	41
	349	800	45	22	46

NR: Not reported; PFS: Progression-free survival; RR: Response rate; SD: Stable disease rate.

### 243 3. Clinical development of imatinib mesilate 245 in patients with GISTs

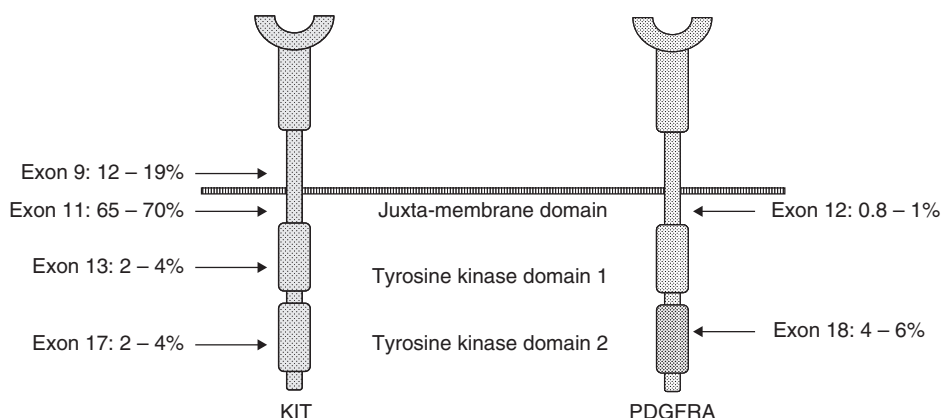
#### 3.1 Clinical trials of imatinib mesilate in patients with advanced GISTs

245 Following the report of the clinical activity of imatinib  
250 mesilate in a patient with GIST [47] and in the Phase I trial  
conducted by the European Organisation for Research and  
255 Treatment of Cancer (EORTC) [43], a Phase II trial was  
launched in the US and Finland (B2222 study) [48]. In the  
latter trial, 147 patients were randomised to imatinib  
mesilate 400 or 600 mg per day. Most patients had  
260 bulky disease and about half of them had previously received  
chemotherapy. In this study, response was assessed using  
solely CT or MRI scan and were classified according to the  
Southwest Oncology Group criteria [49]: complete response  
was defined as complete disappearance of all lesions; partial  
265 response as a 50% decrease in the sum of the product of the  
perpendicular diameters of all measurable lesions, the absence  
of progression, and the absence of new lesions; progression  
as a 50% increase in the sum of the products of the per-  
pendicular diameters of all measurable lesions, appearance of  
270 new lesions; stable disease as a response not qualifying for  
complete or partial response, nor for disease progression.  
The response rate in the initial report by Demetri *et al.* [48]  
was 54% after 9 months of follow up but was 68.1% after  
long-term follow up (71 months), with a median time to  
275 best response of 13 weeks [50]. About a quarter of patients  
took more than 6 months to reach their best response. Only  
14% of patients in this trial had disease progression within  
the first 6 months of the study [50]. Median duration of  
response was 29 months, median time to progression and  
280 overall survival were 24 and 57 months, respectively [48,50].  
There were no significant differences in terms of response  
rates (68.5 versus 67.6%,  $p = 0.7785$ ) or time to progression  
(20 versus 26 months,  $p = 0.3712$ ) between the two dosing  
regimens and 400 mg per day was therefore adopted as the  
standard dose in patients with advanced GIST.

281 In the EORTC Phase II trial, Verweij *et al.* [51] treated  
51 patients with advanced soft tissue sarcoma (STS),  
including 27 patients with GIST, with imatinib mesilate  
800 mg per day. In this trial, responses were classified  
285 according to the Response Evaluation Criteria in Solid  
Tumours (RECIST) criteria [52]. The response rate and  
1-year progression-free survival were 71 and 73% in the  
GIST group, while there were no responses in patients  
with non-GIST sarcomas and the median time to progression  
290 in this STS group was only 58 days [51].

Two large Phase III trials were then launched in parallel  
in North America (S0033 study) and Europe, Italy and  
Australia (EORTC/Italian Sarcoma Group [ISG]/Australian  
Gastro-Intestinal Trials Group [AGITG] 62005 study).  
295 These studies were designed to compare the 'standard' 400 mg  
once daily dose to 400 mg twice daily (800 mg per day)  
dose. In both trials response was assessed using the RECIST  
criteria [51]. Both of these trials showed no increase in  
response rate or overall survival in the twice daily dosing  
300 arms; in the European trial, however, there was an improve-  
ment in progression-free survival in the 800 mg arm, which  
was subsequently confirmed in the meta-analysis of the two  
trials reported at the American Society of Clinical Oncology  
(ASCO) in 2007 [53-55]. These trials did not change  
305 the standard of care established by the initial Phase II trial,  
however the data derived from the two cohorts greatly  
increased the available knowledge of these (not so) rare  
tumours and much information was drawn from subgroup  
analysis of these randomised trials. The main toxicities of  
imatinib mesilate encountered in clinical trials are presented  
310 in Table 1, and efficacy data are given in Table 2.

Both the S0033 and EORTC 62005 studies allowed  
crossover to 800 mg per day in case of progression  
for patients in the 400 mg per day arm. In 2005,  
Zalcberg *et al.* [56] reported on the outcome of 133 patients  
315 crossing over to 800 mg per day in the EORTC trial within  
2 months of documented disease progression. Three patients  
had a partial response (2.3%) and 36 had disease  
318



**Figure 2. Structure of KIT and PDGFRA and location of gastrointestinal stromal tumour (GIST)-associated mutations [13,17,23].**

319 stabilisation (27.1%); median progression-free survival after  
 crossover was 2.7 months, and 18.1% of patients were  
 progression free at 1 year. Anaemia and fatigue were more  
 likely to be worse after crossover but the other toxicities  
 were not significantly increased. Although derived from  
 a subgroup analysis, this study established the increase of  
 325 imatinib mesilate to 800 mg per day (400 mg twice daily)  
 as the standard of care after disease progression on imatinib  
 mesilate 400 mg per day. In the S0033 study, 133 patients  
 were registered on the crossover arm following progression  
 on imatinib mesilate 400 mg per day [57]. Of 117 patients  
 330 assessable for response, three had a partial response (3%)  
 and 33 had stable disease (28%). The median progression-  
 free survival after crossover was 3 months [57]. These data  
 confirm those reported by Zalberg *et al.* [56].

335 A recently reported Phase III trial examined the duration  
 of imatinib mesilate therapy in patients with advanced  
 GISTs. This trial, reported by Blay *et al.* [58], was designed  
 to compare continuous and interrupted imatinib mesilate  
 beyond 1 year of treatment in patients with advanced GISTs.  
 As of April 2004, 182 patients were enrolled, 98 patients  
 340 were in response or stable disease under imatinib mesilate  
 400 mg per day after more than 1 year of follow up,  
 40 were not eligible for randomisation, and 58 patients were  
 randomised. Thirty-two patients were assigned to the inter-  
 345 ruption arm and 26 to the continuation arm. Twenty-six of  
 the 32 patients (81%) in the interruption arm experienced  
 disease progression compared with eight of 26 patients  
 in the continuation arm (30%); median progression-  
 free survival after randomisation was 6.1 months in the  
 interruption arm and 18 months in the continuation arm  
 350 ( $p < 0.0001$ ). These data confirmed the predetermined early  
 stopping rules and the study protocol was amended to  
 randomise patients after 3 years. Preliminary data after  
 354 3 years of imatinib mesilate were reported at the 2007  
 ASCO (Chicago, Illinois) by Le Cesne *et al.* [59]: once again

patients in the interruption arm progressed rapidly after 355  
 randomisation. Of note, the overall survival was comparable  
 in both arms, for both cohorts (i.e., 1 and 3 years) but this  
 trial was clearly underpowered to assess this issue [58,59].  
 These data indicate that imatinib mesilate should be given  
 continuously to patients with advanced GISTs, until disease 360  
 progression or unacceptable toxicity.

#### 4. KIT/PDGFR mutations and sensitivity to imatinib mesilate

365 In 2003 Heinrich *et al.* [13] first reported on the impact of  
*KIT/PDGFR* mutational status and sensitivity to imatinib  
 mesilate in patients treated in the B2222 Phase II trial. This  
 report first provided an insight on the frequency of each  
*KIT* mutation in a prospectively recruited patient cohort. 370  
 Exon 11 mutations were by far the most frequent type  
 of genetic alteration and were present in approximately  
 two-thirds of patients in this trial; exon 9 mutations,  
 the second most frequent molecular alteration, were found  
 in 18% of patients. *KIT* exon 13 and 17 and *PDGFRA* 375  
 exon 12 and 18 mutations were rare events, occurring in  
 1.6, 1.6, 0.8 and 3.6%, respectively (Figure 2). Furthermore,  
 Heinrich *et al.* provided both clinical and biological  
 evidence that the type of mutation correlated with the pro-  
 bability of response to imatinib mesilate: in the group of 380  
 patients with tumours bearing *KIT* exon 11 mutations, the  
 response rate to imatinib mesilate was 83.5%; but was  
 only 47.8% for patients bearing tumours with *KIT* exon 9  
 mutations; this translated into prolonged progression-free  
 and overall survival for patients with tumours expressing 385  
 exon 11 mutant *KIT* isoform compared with tumours with  
 mutations affecting *KIT* exon 9 and tumours with 'wild  
 type' *KIT* and *PDGFRA* [13]. These data were confirmed in  
 an analysis of the EORTC/ISG/AGITG 62005 trial which  
 showed that *KIT* exon 9 mutant and wild type tumours had 390



391 a twofold decrease in the chance of response to imatinib  
mesilate (68 versus 34 and 25% for *KIT* exon 11, *KIT*  
exon 9 and wild type, respectively), as well as a shorter  
395 progression-free survival [60]. This analysis also showed that  
patients with tumours with an exon 9 mutation had a  
significantly improved progression-free survival with a dose  
of 800 mg per day of imatinib mesilate compared with a  
standard dose, with a median progression-free survival up to  
400 18 months versus 6 months for the 400 mg/day group.  
A trend towards overall survival improvement was also  
observed in this series. Although the number of 'exon 9'  
patients was limited, and despite the retrospective nature  
of this study, this observation strongly suggests that higher  
doses of imatinib mesilate may be beneficial for patients  
405 with GISTs bearing *KIT* exon 9 mutations.

The meta-analysis of the US sarcoma S0033 and the  
EORTC/ISG/AGITG 62005 study (meta-GIST) included  
1640 patients [55]. The mutational status was available for  
772 patients (47%). This study confirmed a significant  
410 increase in progression-free survival for patients receiving  
imatinib mesilate 800 mg per day (versus those receiving  
400 mg per day) from 19 to 23 months ( $p = 0.04$ ), which  
did not translate into a survival benefit in the whole cohort  
(median overall survival 49 versus 49 months,  $p = 0.97$ ).  
415 This may have resulted from the fact that many patients  
(although not all patients) received imatinib mesilate  
800 mg after progression in the 400 mg arm.

This meta-analysis also allowed confirmation of the  
prognostic and predictive role (affecting both overall and  
420 progression-free survival) of several factors that had been  
previously reported, such as poor performance status, high  
neutrophil count, absence of *KIT* exon 11 mutation  
and male gender. Other factors showed an impact only  
on progression-free survival, such as small bowel origin  
425 or low haemoglobin level, or on overall survival, such as  
age, low albumin or large lesions.

The meta-GIST study also confirmed on a larger data set  
the interaction between exon 9 mutations and imatinib  
mesilate dose reported by Debiec-Rychter *et al.* [60]. In a  
430 subgroup analysis, patients with tumours bearing an exon 9  
mutant *KIT* isoform benefited from the dose increase  
of imatinib mesilate from 400 to 800 mg daily, although  
once again the benefit in progression-free survival (6 versus  
19 months,  $p = 0.017$ ) did not translate into a significant  
435 overall survival benefit (28 versus 35 months,  $p = 0.15$ ) [55].  
On the basis of these observations, the National Compre-  
hensive Cancer Network (NCCN) [61] as well as the  
European Society for Medical Oncology (ESMO) [62]  
recommended that a dose of 800 mg/day should be used for  
440 patients with advanced GISTs with *KIT* exon 9 mutations.

Finally these data give an insight into the molecular events  
underlying two different clinical courses for patients  
with advanced GISTs receiving imatinib mesilate: a small  
proportion of patients (~ 10%) will display no response  
445 to the drug and progress with 3 months (6 months for

some authors) of treatment initiation, this process is known 446  
as early progression – as virtually all patients eventually  
experience disease progression on imatinib mesilate, the rest  
of the patients will therefore be considered to have late 450  
progression. Although most molecular mechanisms have not  
yet fully been elucidated, those relating to early and late  
progression seem to differ substantially. Indeed, early pro-  
gression seems to be clearly related to the type of mutations  
present in the tumour at the time of treatment initiation:  
455 patients with *KIT* exon 9 mutation and both wild type *KIT*  
and *PDGFRA* genes are at higher risk of early progression  
than patients with *KIT* exon 11 mutations. Late progression,  
however, seems to be, in most cases, the consequence of  
secondary mutations of either *KIT* or *PDGFRA* [63,64].

## 5. Imatinib in the adjuvant setting

Given the high risk of relapse following surgery for localised  
GISTs, especially for larger tumours, and the efficacy of  
imatinib mesilate in the advanced setting, as well as 465  
its favourable safety profile, investigators hypothesised that  
imatinib mesilate given postoperatively after gross complete  
excision of primary GISTs could delay or prevent recurrence  
and therefore improve survival. The safety of imatinib  
mesilate has been evaluated in a Phase II trial which 470  
confirmed its favourable safety profile in this setting [65].  
Three large international Phase III trials led by the American  
College of Surgeon Oncology Group (ACOSOG trial  
Z9001) the EORTC (62024 trial), and Scandinavian  
Sarcoma Group (SSG/AIO XVIII trial) are currently 475  
ongoing. Preliminary data from the ACOSOG Z9001 study  
were reported at the 2007 ASCO meeting. In this study  
patients who had undergone complete gross excision of a  
localised GIST of 3 cm or more were randomly assigned to  
imatinib mesilate 400 mg daily for 1 year or placebo for 480  
1 year. The primary endpoint was progression-free survival.  
Preliminary data showed a major reduction in the risk of  
recurrence from 17 to 3% at 1 year ( $p = 0.01$ ), with no  
significant impact on survival with short-term follow up [66].  
In the European study (EORTC 62024) patients who had 485  
undergone complete gross resection (R0 – R1) of a localised  
GIST classified as intermediate or high risk of malignancy  
(tumour size  $\geq 5$  cm and/or mitotic count  $\geq 5/50$  HPF)  
are randomly assigned to imatinib mesilate 400 mg per day  
for 2 years or observation. Of note, the primary endpoint of 490  
the EORTC trials is overall survival, with progression-free  
survival as a secondary end point. Finally the SSG/AIO  
study will provide important insight into the optimal  
duration of the adjuvant treatment with imatinib: this  
randomised trial, which includes only high-risk GIST 495  
tumours, compares 1 year of postoperative imatinib mesilate  
versus 3 years. This question may be of major importance  
for the future: indeed, in the initial report of the Z9001,  
relapses following interruption of imatinib treatment were  
observed in a few patients treated in the imatinib arm, 500

501 and relapse-free survival seems to converge at late time  
points with fewer patients. Although additional follow up  
is needed and it is not clear now whether adjuvant imatinib  
may actually prevent or delay relapse. In this hypothesis,  
505 a longer duration of adjuvant imatinib treatment would  
be needed, and the optimal duration will be the next  
burning question.

The role of imatinib mesilate in the adjuvant setting  
is currently debated but both NCCN [67] and ESMO  
510 (2008 ESMO guidelines, [62]) have decided to  
retain adjuvant imatinib mesilate as an investigational  
procedure, while the National Institute of Cancer Canada  
(NCIC) recommends it in tumours larger than 6 cm  
(M Blackstein, pers. commun.).

515

## 6. Expert opinion

### 6.1 Long-term toxicities of imatinib mesilate

520 As imatinib mesilate is active over long periods of time and  
has to be given continuously in patients with both chronic  
myeloid leukaemia and GIST, there has been increasing  
concern that this drug may have unexpected long-term  
toxicities. Following the publication of a report in  
*Nature Medicine* in 2006 [68], there has been a great concern  
525 that imatinib mesilate may be cardiotoxic when used in the  
long term. In this report, the authors reported 10 patients  
with no prior history of congestive heart failure (CHF), who  
developed CHF with New York Heart Association (NYHA)  
class 3 – 4 symptoms while on imatinib mesilate. They  
530 further demonstrated that imatinib mesilate was toxic in the  
mouse cardiomyocyte both *in vitro* and *in vivo* [68]. These  
data prompted the investigators from several clinical trials  
on GISTs to include evaluation of the cardiac function  
(either by ultrasonography or using cardiac scintigraphy)  
535 as an inclusion criterion, most notably for patients receiving  
imatinib mesilate in the adjuvant setting. To date, the  
cardiotoxicity of imatinib mesilate remains debated because  
retrospective analysis of large trials failed to demonstrate  
that imatinib mesilate is implicated in cardiac events. In the  
540 EORTC 62005 trial, in which patients were randomised to  
either 400 or 800 mg of imatinib mesilate daily, seven of  
942 patients developed cardiac failure during treatment, one  
of them died of cardiac failure and three other patients died  
of cardiac-related events. Four patients with left ventricular  
545 failure (LVF) prior to treatment recovered during the treat-  
ment period, and one patient who developed LVF during  
treatment recovered while still exposed to the drug. In a  
prospective study assessing both pro-B-type-natriuretic  
peptide and cardiac troponin, only one patient developed  
550 LVF during treatment with imatinib mesilate due to pre-  
existing cardiac valve disease. Furthermore, cardiac troponin T,  
a marker of cardiac injury, remained below the lower limit  
of normal for all patients during the study period.

555 Another issue that has been recently raised is the concern  
that long-term treatment with imatinib mesilate might be

responsible for an increase in the frequency of other 556  
(second) malignancies. This concern is supported by  
preclinical data demonstrating that long-term exposure to  
imatinib mesilate increases the frequency of urogenital  
cancers in the rat [69]. In a retrospective study in patients 560  
treated with imatinib mesilate for CML, Roy *et al.* [70] found  
an increased incidence of prostate cancers compared  
with the local cancer registry. However, in a reply letter,  
Pilot *et al.* from Novartis [69] argued that the methodology  
in this study was not valid as the study did not use age- 565  
adjusted incidence but rather used the crude frequency  
in males aged 40 – 69, an age group in which prostate  
cancer incidence is heterogeneous (median age at diagnosis  
of prostate cancer is 68 and the disease is rare before  
age 55). Furthermore, Pilot *et al.* collated data from a 570  
prospective follow-up study conducted on more than  
9500 patients recruited in clinical trials of imatinib mesilate  
in both CML and GIST. They reported no increase in  
the rate of second malignancy in patients treated with  
imatinib mesilate compared with the incidence for 5-year 575  
age groups reported in the Statistics, Epidemiology and  
End Results (SEER) programme [69].

Therefore, there are currently no data clearly indicating  
that imatinib mesilate has long-term, unexpected toxicities;  
however, since it is a relatively new drug, patients should be 580  
monitored closely for such toxicities [69].

### 6.2 The role of surgery in patients with advanced GISTs in the era of imatinib

585 Although IM yields a high rate of partial response in patients  
with advanced GIST, the rate of complete response is low  
(3 – 5%) [53,57]. One tempting strategy is to surgically  
remove residual masses following imatinib mesilate. Several  
retrospective studies have been reported, showing that  
surgery of advanced GIST was feasible, and that complete 590  
resection was most likely to be achieved for patients respond-  
ing to imatinib mesilate [71-74]. Most of the patients in  
these series continued imatinib mesilate after surgery, even  
when the procedure had removed all macroscopic disease  
(complete response) [71-74]. Patients who underwent surgery 595  
while responding to imatinib mesilate clearly had a better  
outcome than patients operated for local or diffuse disease  
progression. In the study by Bonvalot *et al.* [73], the median  
progression-free survival calculated from the start of  
imatinib mesilate therapy was 18.7 months, which does not 600  
seem to be significantly different from that reported  
for patients treated with imatinib mesilate without  
surgery [50,53,57]. The role of surgery in patients with  
advanced GIST responding to imatinib mesilate is therefore  
debated. The EORTC is currently planning a randomised 605  
trial to assess this question.

In patients with generalised disease progression on  
imatinib mesilate, most series have shown that surgery is of  
no benefit. However, in patients with localised disease  
progression, the median progression-free survival following 610

611 surgical resection is 6 months, which is comparable to that  
612 obtained with sunitinib after failure of imatinib mesilate.

### 6.3 Observance of orally bioavailable drugs

615 Imatinib mesilate is an orally available drug, with a very  
616 favourable safety profile, which makes it a very attractive  
617 drug, and has led to its evaluation in numerous tumour  
618 types including small cell lung cancer, germ cell cancer,  
619 melanoma, and other KIT- or PDGFR-expressing solid  
620 tumours [75]. Contrary to the expected effects of  
621 chemotherapy, for which the reported toxicity is usually  
622 short lasting because treatment is administered as a single  
623 infusion every 2 or 3 weeks, the toxic side effects of  
624 imatinib mesilate, although rare and mild in intensity, are  
625 in most cases nearly constant. Furthermore the drug has to  
626 be taken continuously to be efficient, as suggested by the  
627 results of the French Sarcoma Group study [58,59]. This  
628 information has to be taken into account when assessing  
629 the toxicity of orally administered targeted therapies in  
630 general and of imatinib mesilate in particular. This is  
631 especially relevant because observance studies performed in  
632 more than 3000 CML and GIST patients show that  
633 overall compliance is 75% (calculated as prescribed medi-  
634 cation dose/actually taken medication dose), with CML  
635 patients being slightly more compliant than GIST patients  
636 (78 versus 73% compliance, respectively) and only 50%  
637 of patients are 100% compliant [76].

### 6.4 Prolonged survival after imatinib resistance

640 Imatinib mesilate has dramatically changed the outcome of  
641 patients with advanced and metastatic gastrointestinal  
642 stromal tumours. Indeed, the reported median overall  
643 survival was 12 – 15 months in the preimatinib era [77],  
644 which contrasts with the 19 – 23 months progression-free  
645 and 57 months median overall survival reported with  
646 imatinib mesilate in clinical trials with the longest follow  
647 up [50,55]. The overall survival is however difficult to  
648 interpret and translate into the community setting. Indeed,  
649 most, if not all, the patients whose outcome was reported in  
650 clinical trials of imatinib mesilate were treated at referral  
651 institutions and were likely offered the possibility to test  
652 investigational agents after progression under imatinib  
653 mesilate. The impact of these second and later line treat-  
654 ments on the final overall survival of these patients is unclear.  
655 It is noteworthy, however, that median overall survival  
656 exceeds the median progression-free survival by more than

657 30 months in most series, while in the preimatinib era,  
658 median overall survival was close to 12 months. Some  
659 patients treated at our institution have received multiple  
660 lines [3-5] of investigational targeted agents in the setting of  
661 clinical trials; therefore their overall survival is likely the  
662 result of multiple lines of therapy, including (but not  
663 restricted to) sunitinib malate, which is now approved for  
664 patients with GISTs progressing after imatinib mesilate or  
665 intolerant to the drug. Imatinib mesilate has never been  
666 tested in a Phase III trial against standard chemotherapy or  
667 placebo and best supportive care, due to the fact that when  
668 the results of the initial Phase II trial were disclosed [48]  
669 it was felt that such a trial would be unethical. Indeed,  
670 comparison of the survival curves of patients receiving  
671 imatinib mesilate for advanced disease with historical  
672 controls (patients receiving doxorubicin-based regimens, data  
673 from the EORTC trials database) shows an unequivocal  
674 improvement of survival with imatinib [53]. These assump-  
675 tions are supported by a recently reported epidemiological  
676 study based on SEER data, showing that overall median  
677 survival of patients with advanced GIST shifted from 12  
678 to 33 for patients diagnosed during the 1995 – 2000  
679 and the 2001 – 2004 periods, respectively [78].

680 Another critical issue may be that a continuous blockade  
681 by imatinib mesilate is most often given to the patient, even  
682 after demonstrated progression, enabling sensitive tumour  
683 cell clones to be efficiently controlled *in vivo* in these  
684 patients. Because of its clonal nature in most patients, GIST  
685 with resistance to imatinib may become the first model in  
686 which continued blockade of the molecular target, even  
687 partially resistant, is proved useful; however, this will require  
688 carefully designed prospective trials to be demonstrated.

689 Finally, few studies have addressed the cost-effectiveness  
690 of imatinib mesilate in the treatment of patients with  
691 advanced GISTs [79,80]. These studies concluded that the  
692 cost-effectiveness of imatinib mesilate in that setting  
693 was within a commonly accepted range, both in the US  
694 and the UK.

### Declaration of interest

695 PA Cassier and A Dufresne have received research  
696 grants from Chugai. I Ray-Coquard has received research  
697 grants from Merck. J-Y Blay has received honoraria  
698 from Novartis, Pfizer, GSK and Pharmamar for his  
699 consultant/advisory role.  
700  
701

**Bibliography**

1. Monges G, Coindre J, Scoazec J, et al. Incidence of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) in France: results of the PROGIST survey conducted among pathologists. *ASCO Meeting Abstracts* 2007;25:10047
2. Rubio J, Marcos-Gragera R, Ortiz MR, et al. Population-based incidence and survival of gastrointestinal stromal tumours (GIST) in Girona, Spain. *Eur J Cancer* 2007;43:144-8
3. Nilsson B, Bummig P, Meis-Kindblom JM, et al. Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era: a population-based study in western Sweden. *Cancer* 2005;103:821-9
4. Dematteo RP, Lewis JJ, Leung D, et al. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg* 2000;231:51-8
5. Alvarado-Cabrero I, Vazquez G, Sierra Santiesteban FI, et al. Clinicopathologic study of 275 cases of gastrointestinal stromal tumors: the experience at 3 large medical centers in Mexico. *Ann Diagn Pathol* 2007;11:39-45
6. Miettinen M, Furlong M, Sarlomo-Rikala M, et al. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the rectum and anus: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 144 cases. *Am J Surg Pathol* 2001;25:1121-33
7. Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005;29:52-68
8. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol* 2006;23:70-83
9. Miettinen M, Makhlof H, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before imatinib with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2006;30:477-89
10. Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2004;22:3813-25
11. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279:577-80
12. Rubin BP, Singer S, Tsao C, et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2001;61:8118-21
13. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003;21:4342-9
14. Lux ML, Rubin BP, Biase TL, et al. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000;156:791-5
15. Lasota J, Wozniak A, Sarlomo-Rikala M, et al. Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. A study of 200 cases. *Am J Pathol* 2000;157:1091-5
16. Rubin BP, Singer S, Tsao C, et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2001;61:8118-21
17. Corless CL, McGreevey L, Haley A. KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size. *Am J Pathol* 2002;160:1567-72
18. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003;299:708-10
19. Corless CL, Schroeder A, Griffith D, et al. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol* 2005;23:5357-64
20. Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Sobin LH, Miettinen M. A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. *Lab Invest* 2004;84:874-83
21. Wardelmann E, Hrychuk A, Merkelbach-Bruse S, et al. Association of platelet-derived growth factor receptor alpha mutations with gastric primary site and epithelioid or mixed cell morphology in gastrointestinal stromal tumors. *J Mol Diagn* 2004;6:197-204
22. Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, et al. Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 1999;59:4297-300
23. Singer S, Rubin BP, Lux ML, et al. Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2002;20:3898-905
24. Kawanowa K, Sakuma Y, Sakurai S, et al. High incidence of microscopic gastrointestinal stromal tumors in the stomach. *Hum Pathol* 2006;37:1527-35
25. Agaimy A, Wunsch PH, Hofstaedter F, et al. Minute gastric sclerosing stromal tumors (GIST tumorlets) are common in adults and frequently show c-KIT mutations. *Am J Surg Pathol* 2007;31:113-20
26. Blay JY, Bonvalot S, Casali P, et al. Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors. Report of the GIST Consensus Conference of 2004 March 20 – 21; under the auspices of ESMO. *Ann Oncol* 2005;16:566-78
27. Plaat BE, Hollema H, Molenaar WM, et al. Soft tissue leiomyosarcomas and malignant gastrointestinal stromal tumors: differences in clinical outcome and expression of multidrug resistance proteins. *J Clin Oncol* 2000;18:3211-20
28. Hsu KH, Yang TM, Shan YS, Lin PW. Tumor size is a major determinant of recurrence in patients with resectable gastrointestinal stromal tumor. *Am J Surg* 2007;194:148-52
29. Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *Hum Pathol* 2002;33:459-65
30. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:1466-78
31. Savage DG, Antman KH. Imatinib mesylate: a new oral targeted therapy. *N Engl J Med* 2002;346:683-93
32. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2005;105:2640-53
33. Dewar AL, Cambareri AC, Zannettino AC, et al. Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib. *Blood* 2005;105:3127-32

34. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, et al. Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2558-62
35. Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, et al. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 2000;96:925-32
36. Tuveson DA, Willis NA, Jacks T, et al. STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications. *Oncogene* 2001;20:5054-8
37. Gardner ER, Burger H, van Schaik RH, et al. Association of enzyme and transporter genotypes with the pharmacokinetics of imatinib. *Clin Pharmacol Ther* 2006;80:192-201
38. Champagne MA, Capdeville R, Krailo M, et al. Imatinib mesylate (STI571) for treatment of children with Philadelphia chromosome-positive leukemia: results from a Children's Oncology Group phase 1 study. *Blood* 2004;104:2655-60
39. Peng B, Hayes M, Resta D, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *J Clin Oncol* 2004;22:935-42
40. Wen PY, Yung WK, Lamborn KR, et al. Phase I/II study of imatinib mesylate for recurrent malignant gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 99-08. *Clin Cancer Res* 2006;12:4899-907
41. Dutreix C, Peng B, Mehning G, et al. Pharmacokinetic interaction between ketoconazole and imatinib mesylate (Glivec) in healthy subjects. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;54:290-4
42. O'Brien SG, Meinhardt P, Bond E, et al. Effects of imatinib mesylate (STI571, Glivec) on the pharmacokinetics of simvastatin, a cytochrome p450 3A4 substrate, in patients with chronic myeloid leukaemia. *Br J Cancer* 2003;89:1855-9
43. Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 2001;344:1052-6
44. van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, et al. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet* 2001;358:1421-3
45. Ramanathan RK, Egorin MJ, Takimoto CH, et al. Phase I and pharmacokinetic study of imatinib mesylate in patients with advanced malignancies and varying degrees of liver dysfunction: a study by the National Cancer Institute Organ Dysfunction Working Group. *J Clin Oncol* 2008;26:563-9
46. Gibbons J, Egorin MJ, Ramanathan RK, et al. Phase I and pharmacokinetic study of imatinib mesylate in patients with advanced malignancies and varying degrees of renal dysfunction: a study by the National Cancer Institute Organ Dysfunction Working Group. *J Clin Oncol* 2008;26:570-6
47. Judson IR. Imatinib for patients with liver or kidney dysfunction: no need to modify the dose. *J Clin Oncol* 2008;26:521-2
48. Demetri GD, von MM, Blanke CD, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002;347:472-80
49. Green S, Weiss GR. Southwest Oncology Group standard response criteria, endpoint definitions and toxicity criteria. *Invest New Drugs* 1992;10:239-53
50. Blanke CD, Demetri GD, von Mehren M, et al. Long-term results from a randomized phase II trial of standard- versus higher-dose imatinib mesylate for patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing KIT. *J Clin Oncol* 2008;26:620-5
51. Verweij J, Van OA, Blay JY, et al. Imatinib mesylate (STI-571 Glivec, Gleevec) is an active agent for gastrointestinal stromal tumours, but does not yield responses in other soft-tissue sarcomas that are unselected for a molecular target. Results from an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group phase II study. *Eur J Cancer* 2003;39:2006-11
52. Therasse P, Arbuick SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:205-16
53. Verweij J, Casali PG, Zalcberg J, et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet* 2004;364:1127-34
54. Rankin C, Von Mehren M, Blanke C, et al. Dose effect of imatinib (IM) in patients (pts) with metastatic GIST: Phase III Sarcoma Group Study S0033. *ASCO Meeting Abstracts* 2004;22:9005
55. Van Glabbeke MM, Owzar K, Rankin C, et al. GIST Meta-analysis Group. Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors (GIST): a meta-analysis based on 1,640 patients (pts). *ASCO Meeting Abstracts* 2007;25:10004
56. Zalcberg JR, Verweij J, Casali PG, et al. Outcome of patients with advanced gastro-intestinal stromal tumours crossing over to a daily imatinib dose of 800 mg after progression on 400 mg. *Eur J Cancer* 2005;41:1751-7
57. Blanke CD, Rankin C, Demetri GD, et al. Phase III randomized, intergroup trial assessing imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing the kit receptor tyrosine kinase: S0033. *J Clin Oncol* 2008;26:626-32
58. Blay JY, Le CA, Ray-Coquard I, et al. Prospective multicentric randomized phase III study of imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors comparing interruption versus continuation of treatment beyond 1 year: the French Sarcoma Group. *J Clin Oncol* 2007;25:1107-13
59. Le Cesne A, Ray-Coquard I, Bui B, et al. Continuous versus interruption of imatinib (IM) in responding patients with advanced GIST after three years of treatment: a prospective randomized phase III trial of the French Sarcoma Group. *ASCO Meeting Abstracts* 2007;25:10005
60. Debiec-Rychter M, Sciot R, Le Cesne, et al. KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Cancer* 2006;42:1093-103
61. Demetri GD, Benjamin RS, Blanke CD, et al. NCCN Task Force report. Management of patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST): update of the

## Imatinib mesilate

- NCCN clinical practice guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2007;5(Suppl 2):S1-29
62. Casali PG, Jost L, Reichardt P, et al. Gastrointestinal stromal tumors: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2008; In press
63. Heinrich MC, Maki RG, Corless CL, et al. Sunitinib (SU) response in imatinib-resistant (IM-R) GIST correlates with KIT and PDGFRA mutation status. *ASCO Meeting Abstracts* 2006;24:9502
64. Debiec-Rychter M, Cools J, Dumez H, et al. Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against imatinib-resistant mutants. *Gastroenterology* 2005;128:270-9
65. Dematteo RP, Antonescu CR, Chadaram V, et al. Adjuvant imatinib mesylate in patients with primary high risk gastrointestinal stromal tumor (GIST) following complete resection: safety results from the US Intergroup Phase II trial ACOSOG Z9000. *ASCO Meeting Abstracts* 2005;23:9009
66. Dematteo RP, Owzar K, Maki R, et al. Adjuvant imatinib mesylate increases recurrence free survival (RFS) in patients with completely resected localized primary gastrointestinal stromal tumor (GIST): North American Intergroup Phase III trial ACOSOG Z9001. *ASCO Meeting Abstracts* 2007;25:10079
67. Demetri GD, Benjamin RS, Blanke CD, et al. NCCN Task Force report. Management of patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST): update of the NCCN clinical practice guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2007;5(Suppl 2):S1-29; quiz S30
68. Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, et al. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med* 2006;12:908-16
69. Pilot PR, Sablinska K, Owen S, Hatfield A. Epidemiological analysis of second primary malignancies in more than 9500 patients treated with imatinib. *Leukemia* 2006;20:148
70. Roy L, Guilhot J, Martineau G, et al. Unexpected occurrence of second malignancies in patients treated with interferon followed by imatinib mesylate for chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 2005;19:1689-92
71. Raut CP, Posner M, Desai J, et al. Surgical management of advanced gastrointestinal stromal tumors after treatment with targeted systemic therapy using kinase inhibitors. *J Clin Oncol* 2006;24:2325-31
72. Bonvalot S, Eldweny H, Pechoux CL, et al. Impact of surgery on advanced gastrointestinal stromal tumors (GIST) in the imatinib era. *Ann Surg Oncol* 2006;13:1596-603
73. Rutkowski P, Nowecki Z, Nyckowski P, et al. Surgical treatment of patients with initially inoperable and/or metastatic gastrointestinal stromal tumors (GIST) during therapy with imatinib mesylate. *J Surg Oncol* 2006;93:304-11
74. Gronchi A, Fiore M, Miselli F, et al. Surgery of residual disease following molecular-targeted therapy with imatinib mesylate in advanced/metastatic GIST. *Ann Surg* 2007;245:341-6
75. Arifi S, El Sayadi H, Dufresne A, et al. Glivec and solid tumours. *Bull Cancer* 2007;95:99-106
76. Tsang J, Rudychev I, Pescatore SL. Prescription compliance and persistency in chronic myelogenous leukemia (CML) and gastrointestinal stromal tumor (GIST) patients (pts) on imatinib (IM). *ASCO Meeting Abstracts* 2006;24:6119
77. Dematteo RP, Heinrich MC, El-Rifai WM, Demetri G. Clinical management of gastrointestinal stromal tumors: before and after STI-571. *Hum Pathol* 2002;33:466-77
78. Artinyan A, Kim J, Soriano P, Ellenhorn JD. Survival from metastatic gastrointestinal stromal tumors in the era of imatinib. *Proceedings of the 2008 Gastrointestinal Cancer Symposium; Orlando, Florida; 2008*. Available from: [http://www.asco.org/ASCO/Abstracts+%26+Virtual+Meeting/Abstracts?&vmview=abst\\_detail\\_view&confID=53&abstractID=10708](http://www.asco.org/ASCO/Abstracts+%26+Virtual+Meeting/Abstracts?&vmview=abst_detail_view&confID=53&abstractID=10708)
79. Wilson J, Connock M, Song F, et al. Imatinib for the treatment of patients with unresectable and/or metastatic gastrointestinal stromal tumours: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2005;9:1-142
80. Huse DM, von MM, Lenhart G, et al. Cost effectiveness of imatinib mesylate in the treatment of advanced gastrointestinal stromal tumours. *Clin Drug Investig* 2007;27:85-93

### Affiliation

Philippe A Cassier<sup>1</sup>, Armelle Dufresne<sup>1</sup>, Samia Arifi<sup>1</sup>, Hiba El Sayadi<sup>2</sup>, Intidar Labidi<sup>2</sup>, Isabelle Ray-Coquard<sup>2</sup>, Séverine Tabone<sup>3</sup>, Pierre Méeus<sup>4</sup>, Dominique Ranchère<sup>5</sup>, Marie-Pierre Sunyach<sup>2</sup>, Anne-Valérie Decouvelaere<sup>2</sup>, Laurent Alberti<sup>3</sup> & Jean-Yves Blay<sup>†1,3</sup>

<sup>†</sup>Author for correspondence

<sup>1</sup>Unité de Jour d'Oncologie Médicale Multidisciplinaire, Pavillon E,

Hôpital Edouard Herriot, 5 place d'Arsonval, 69003, Lyon, France

Tel: +33 472 11 73 98; Fax: +33 472 11 73 28; E-mail: [blay@lyon.fnclcc.fr](mailto:blay@lyon.fnclcc.fr)

<sup>2</sup>Centre Léon Bérard,

Département de médecine, Lyon, France

<sup>3</sup>Unité INSERM U590,

Centre Léon Bérard, Lyon, France

<sup>4</sup>Centre Léon Bérard,

Département de chirurgie, Lyon, France

<sup>5</sup>Centre Léon Bérard,

Département d'anatomopathologie, Lyon, France

## KIT Mutations Induce Intracellular Retention and Activation of an Immature Form of the KIT Protein in Gastrointestinal Stromal Tumors

Séverine Tabone-Eglinger,<sup>1</sup> Frédéric Subra,<sup>5</sup> Hiba El Sayadi,<sup>1</sup> Laurent Alberti,<sup>1</sup> Eric Tabone,<sup>2</sup> Jean-Philippe Michot,<sup>2</sup> Nathalie Théou-Anton,<sup>4</sup> Antoinette Lemoine,<sup>4</sup> Jean-Yves Blay,<sup>1,3</sup> and Jean-François Emile<sup>4,6,7</sup>

**Abstract** **Purpose:** Gastrointestinal stromal tumors (GIST) are frequently associated with gain-of-function mutations of *KIT*, which can be inhibited by imatinib both *in vitro* and *in vivo*. The survival of patients with GIST, following imatinib therapy, has been correlated with the nature of mutations but not with *KIT* expression. **Experimental Design:** Subcellular localization, activation, and trafficking of the mature and the immature forms of *KIT* were investigated in GIST samples and in NIH3T3 cells infected with two different GIST-type exon 11 – mutated human *KIT* cDNA. **Results:** Paranuclear dot expression of *KIT* was more frequent in GISTs with homozygous *KIT* mutations than in those with heterozygous ( $P = 0.01$ ) or no mutations ( $P < 0.01$ ). Activation of the immature 125 kDa form of *KIT* was detected in most GISTs with *KIT* mutations but not in GISTs without *KIT* mutations. In NIH3T3 cells, mutant *KIT* was mainly retained within endoplasmic reticulum and Golgi compartments in an immature constitutively phosphorylated form, whereas the wild-type *KIT* was expressed at the plasma membrane, in a mature nonphosphorylated form. Imatinib-induced inhibition of the phosphorylation of immature and mature mutant *KIT* proteins resulted in the restoration of *KIT* expression at the cell surface. **Conclusions:** These results show that GIST-type *KIT* mutations induce an activation-dependent alteration of normal maturation and trafficking, resulting in the intracellular retention of the activated kinase within the cell. These observations likely account for the absence of correlation between response to imatinib and *KIT* expression using immunohistochemistry and may deserve to be investigated in other tyrosine kinase – activated tumors.

Gastrointestinal stromal tumors (GIST) are the most frequent sarcomas of the digestive tract and express *KIT* protein in >95% of cases (1). Gain-of-function mutations in the *KIT* gene, and more recently, in the *PDGFRA* gene, have been shown to play a critical oncogenic role in GISTs (2–4). Imatinib mesylate, a *KIT*

and *PDGFR* tyrosine kinase inhibitor, blocks the activation of both receptors *in vitro* and induces tumor control in >90% of patients with GIST (5–8). More than 80% of *KIT* mutations occur in exon 11 with a hotspot in the 550 to 561 codon region, whereas mutations in exon 9 and in exons 13 to 17 are observed in 10% to 15% and <1% of metastatic tumors, respectively (5, 9–13). Correlations between the nature of mutation (exon 11 versus others and sites of mutations within exon 11) and disease outcome prior to imatinib therapy has been reported in some but not all studies (9–12, 14–20). Conversely, response to imatinib therapy has consistently been influenced by the nature of *KIT* mutations: patients with exon 11 mutations were reported to have a better survival with imatinib than exon 9 or wild-type (WT) forms (5, 6). Of note, deletions involving the distal part of *KIT* exon 11 may be less favorable for response to imatinib (21). An intriguing observation is that immunohistochemical expression of the *KIT* protein in *KIT*-positive GISTs is not correlated with imatinib activity *in vivo* (22), in contrast with observations in other models such as *HER2* amplification in breast cancer (23).

In the present work, we observed that *KIT* mutations result in the modification of the protein subcellular localization. In GISTs, as well as in NIH3T3-infected cells, mutated forms of *KIT* were mainly expressed in an immature phosphorylated-activated form within the intracellular compartments and with limited expression at the cell surface in this model. Activation

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Equipe Cytokines et Cancers, INSERM U590 and <sup>2</sup>Service d'Anatomie Pathologique, Centre Léon Bérard, <sup>3</sup>Université Claude Bernard Lyon 1 and Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France, <sup>4</sup>INSERM U602, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France, <sup>5</sup>ENS Cachan, LBPA, UMR 8113, Cachan, France, <sup>6</sup>Hôpital Ambroise Paré APHP, Boulogne, France, and <sup>7</sup>PRES Universud and UVSQ, Versailles, France

Received 9/5/07; revised 11/5/07; accepted 11/5/07.

**Grant support:** S. Tabone-Eglinger is a fellow of ANRT, with financial support from Centre Léon Bérard Cancer and Novartis SA. J.-Y. Blay and J.-F. Emile received research grants from Novartis. Novartis also kindly provided imatinib mesylate. Association pour la Recherche sur le Cancer, CONTICANET, Network of Excellence FP6-018806, Ligue Contre le Cancer (Comité de l'Ain et Comité du Rhône), the Breast Cancer Research Foundation, Institut National du Cancer, Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône Alpes, and BQR2007 Université Versailles SQY.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

**Note:** J.-Y. Blay and J.-F. Emile contributed equally to this work.

**Requests for reprints:** Jean-Yves Blay, Centre Léon Bérard, Equipe Cytokines et Cancers, 28 rue Laënnec, 69373 Lyon cedex 08, France. Phone: 33-47878-7138; Fax: 33-47878-2720; E-mail: blay@lyon.fnclcc.fr.

© 2008 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4102

of the immature form of KIT was only detectable in cells expressing exon 11 *KIT* juxtamembrane mutations; imatinib-induced blockade of the activation of the immature KIT form restored the expression of the mature form at the cell surface.

## Materials and Methods

**Reagents and antibodies.** Recombinant human SCF (rhSCF) used for the assays was purchased from R&D Systems. Chinese hamster ovary-KL, used for the culture, was a kind gift from P. Dubreuil (UMR 599, Centre de Recherche en Cancérologie, Marseille, France). Imatinib mesylate was kindly provided by Novartis. The rabbit polyclonal anti-KIT antibody (A4502), used for immunocytochemistry and Western blot, and the phycoerythrin-conjugated mouse monoclonal anti-KIT antibody (clone 1045D2) used for flow cytometry analysis were from Dako. The antiphosphotyrosine 823 of KIT (pY823KIT) and the antiphosphotyrosine 703 of KIT (pY703KIT), used for Western blot and immunocytofluorescence analysis, were purchased from Clinisciences. For immunohistochemistry assays, CD34 (clone QBEND mouse) was purchased from Immunotech, and anti-S100 protein (polyclonal rabbit) was from Dako. Anti- $\beta$ -actin antibody (Sigma-Aldrich) and secondary horseradish peroxidase antibodies (Dako) were used in Western blotting experiments, whereas rabbit anti-calnexin, mouse anti-Golgin58K (Abcam), anti-rabbit biotin (Dako), streptavidin-Alexa 594, anti-rabbit Alexa 647, and anti-mouse IGG1 Alexa 647 (Molecular Probes/Invitrogen) were used for immunofluorescence analysis.

**Analysis of human GIST samples.** The records of patients with GIST were retrieved from the files of Ambroise Paré University Hospital. Histology and immunohistochemistry of all cases were reviewed. Clinical records were reviewed as well, and no patients had received imatinib before surgical resection of the tumor. All the human samples were obtained by surgical resection done for therapeutic purposes and according to French ethical guidelines.

Mutations within exons 9, 11, 13, and 17 of *KIT* and within exons 12 and 18 of *PDGFRA* were detected as previously described (10, 24). Briefly, tumor DNA was extracted from either frozen or paraffin tumor samples after morphologic control. Screening of insertions and deletions within exons 9 and 11 of *KIT* and within exons 12 and 18 of *PDGFRA* was done by length analysis of PCR products (25), which allows the quantification of the mutant/wild-type ratio, and all samples were subjected to direct sequencing. Deletions or insertions within *KIT* exons 11 and 9 were considered as homozygous, when the fluorescence intensity of the mutant allele was at least three times higher than that of the wild-type allele. In all cases, histology confirmed that the analyzed sample contained >90% of tumor cells.

Immunohistochemistry was done on 4- $\mu$ m-thick slides of paraffin-embedded GIST samples with anti-CD117 (1/300), anti-CD34 (1/2), and anti-S100 (1/200) antibodies. Slides were immersed for 20 min in a boiling antigen retrieval citrate buffer (pH 6), and staining was revealed with LSAB2 KIT (Dako). The cellular localization of KIT staining from 82 paraffin-embedded GIST samples was evaluated without knowledge of the mutational status.

Analysis of KIT expression and activation was done on 26 frozen GIST samples by Western blotting experiments. Samples were calibrated

and mechanically homogenized (Mixer Mill MM 300) in lysis buffer (20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L orthovanadate, 10 mmol/L NaF, 1 mmol/L PMSF, 0.5  $\mu$ g/mL leupeptin, 1  $\mu$ g/mL pepstatin, 10 IU/mL aprotinin, and 1% Triton X-100). Lysates were rocked for 30 min at 4°C, and then centrifuged to remove insoluble material. Supernatant protein contents were determined using Bradford solution. The normalized soluble proteins (supernatant fraction) were directly analyzed by SDS-PAGE Western blotting with anti-KIT, anti-pY703KIT, anti-pY823KIT, and anti- $\beta$ -actin antibodies.

**Production of recombinant viruses and NIH3T3 infection.** The full-length human *KIT* cDNA (GNNK isoform), and two mutants (*KITdel557-558* and *KITdel564-581*) were excised from the pGEM-Teasy plasmid through *SalI* and *NotI* restriction and inserted in oncoviral vectors pLNCX (Clontech) and MigR1 (26) for wild-type and mutant forms, respectively. Both retroviral vectors included the same cytomegalovirus promoter. To produce viral stocks, the plasmids pLNCX *KIT*-wt and MIGR *KIT*-mutants were independently cotransfected with plasmid pMD.G (VSV.G envelope) and pBR322 containing inserts Gag-PolGpt into 293T cells using the standard calcium phosphate procedure. Briefly, 293T cells ( $2.5 \times 10^6$ ) were cotransfected with 15  $\mu$ g of retroviral vector (pLNCX or MigR1), 10  $\mu$ g of pBR322, and 5  $\mu$ g of pMD.G for 12 h. The next day, the medium containing the virus was harvested. Titers of produced retroviral vectors were determined after infection on NIH3T3 cells and either resistance to geneticin (0.8-1 mg/mL) for pLNCX, either green fluorescent protein expression for MigR1 (the expression of green fluorescent protein is regulated by an internal ribosome entry sequence). Infection of NIH3T3 cells were done at a multiplicity of infection of 0.5. Cells with the pLNCX vector were selected with geneticin for 7 to 10 days (maintained for the culture) before being isolated and amplified. Cells with the MigR1 vector were amplified for 48 h after infection and green fluorescent protein-positive cells were sorted.

**Cell culture.** NIH3T3-infected cells were cultivated in DMEM with 10% newborn calf serum (Life Technologies), 2% penicillin/streptomycin, and 50 ng/mL of Chinese hamster ovary-mouse SCF so that the growth of wild-type and mutant forms were equivalent. Chinese hamster ovary-mouse SCF was removed during serum starvation for the assays.

To study proliferation in low serum concentrations, cells were plated at 50,000 cells per well, then starved for 4 h before incubation with DMEM containing 1% serum for the times indicated. At each time point, cells were harvested, suspended in a precise volume of medium, and then counted with a FACS scan (Becton Dickinson). Results were expressed as mean of triplicate  $\pm$  SD.

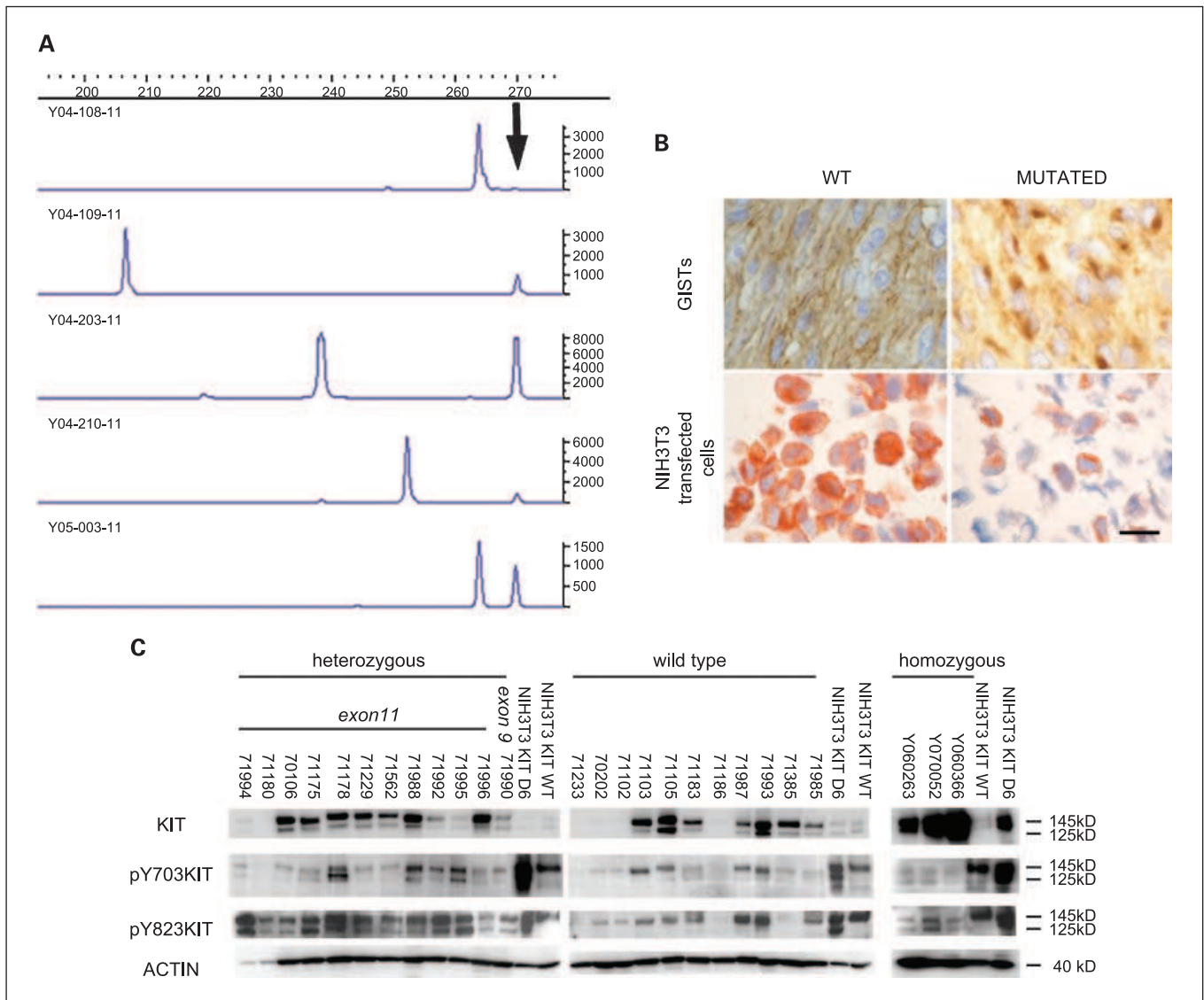
To perform soft agar assays, cells were plated at 10,000 in 1 mL of 0.33% agar (Difco) in DMEM + 10% newborn calf serum with or without rhSCF, over a 0.5% 1 mL agar layer in triplicate in 35 mm dishes. After 3 weeks, plates were stained with 0.005% crystal violet and colonies were counted with Gene Tools software (Ozyme). Each condition was done in triplicate and results are given as the mean number of colonies.

**mRNA analysis.** The mRNA of NIH3T3 cells was extracted according to TRIzol method (Invitrogen). Then, 5  $\mu$ g of RNA was submitted to reverse transcriptase (Super Script II, Invitrogen). Real-time PCR and subsequent calculations were done with the ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems).

**Table 1.** Comparison of KIT subcellular staining in three subsets of patients with GIST

	Total	Primary site			KIT staining of GIST cells		
		Gastric	Small intestine	Other	Cytoplasm	Golgi-like	Membrane
Homozygous <i>KIT</i> mutation	17	9	3	5	14	12	5
No mutation of <i>KIT</i> or <i>PDGFRA</i>	14	4	6	4	10	2	9
Heterozygous <i>KIT</i> mutation	51	26	21	4	32	18	31





**Fig. 1.** KIT perinuclear expression in GISTs with homozygous mutations and phosphorylation of the immature KIT form in GIST protein extracts. *A*, wild-type (*arrow*; 270 bp) and mutant alleles of *KIT* were detected by length analysis for fluorescent PCR products. These five GISTs had deletions within exon 11 of *KIT*, three of which were considered as homozygous (cases Y04-108, Y04-109, and Y04-210) because of the low amount of wild-type as compared with mutant alleles. *B*, KIT immunohistochemical staining of GIST on paraffin-embedded samples (*top*) and NIH3T3 embedded cells (*bottom*) disclosed a predominant Golgi-like pattern in GISTs with homozygous *KIT* mutations or in NIH3T3 *KIT* D6-infected cells (*right*) and a membrane and/or cytoplasmic pattern in GISTs without mutations or NIH3T3 WT *KIT*-infected cells (*left*). Bar, 20  $\mu$ mol/L. *C*, Western blot analysis of protein extracts of GIST frozen samples disclosed a variable KIT expression, with a main heavy (mature, 145 kDa) and a minor light (immature, 125 kDa) form. KIT phosphorylation (Tyr<sup>703</sup> and Tyr<sup>823</sup> residues) of both forms was analyzed in GISTs with heterozygous or homozygous *KIT* mutations and GISTs without mutations of *KIT* and *PDGFRA*. Protein extracts of wild-type NIH3T3- and D6-infected cells were analyzed in each blot as a control of KIT expression and phosphorylation.  $\beta$ -Actin expression was analyzed as a loading control.

Primers and probes were described previously (24). The PCR mixture contained 1  $\times$  TaqMan Universal PCR Master Mix reagents (Applied Biosystems), 400 nmol/L of *KIT* forward and reverse primers, 200 nmol/L of probe, 0.25  $\mu$ mol/L of amperase UNG, and 5  $\mu$ g of *KIT* cDNA in a total volume of 50  $\mu$ L. PCR conditions consisted of two steps of 5 min each at 55°C and 5 min at 95°C, followed by 50 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. TaqMan rRNA control reagents (Applied Biosystems), designed for ribosomal 18S RNA amplification, were used as references to normalize the results. Experiments were done in triplicate. Results were expressed as ratios of *KIT* to 18S PCR products (equivalency of the efficacy of the two PCRs was previously verified).

**Protein analysis.** NIH3T3 cells were grown to 80% confluence in complete medium, and then starved for 4 h before incubation with rhSCF or imatinib for the concentrations and times indicated. Cells were

washed with cold PBS, and lysed directly in culture plates with 200  $\mu$ L/10 cm<sup>2</sup> of lysis solution [10 mmol/L TRIS (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L sodium orthovanadate, 10 mmol/L NaF, 1 mmol/L PMSF, 0.5  $\mu$ g/mL leupeptin, 1  $\mu$ g/mL pepstatin A, and 10 IU/mL aprotinin] for 30 min at 4°C. The soluble protein (supernatant fraction) was either directly analyzed by SDS-PAGE Western blotting or first immunoprecipitated with the rabbit anti-KIT antibody.

For cell surface biotinylation of the protein, cells were labeled with Sulfo-NHS biotin (Perbio Science) according to the manufacturer's instructions before protein extraction, KIT immunoprecipitation, and Western blotting analysis.

**Flow cytometry.** NIH3T3 were grown to 80% confluence in complete DMEM, then serum-starved for 4 h before incubation or

not with SCF or imatinib. Cells were then harvested and resuspended in cold PBS before incubation with a phycoerythrin-conjugated anti-KIT antibody (Dako) for 15 min at 4°C. Cells were analyzed by flow cytometry on a FACS Scan (Becton Dickinson) and analyzed with Cell Quest Pro Software (Becton Dickinson). Results were expressed as mean of fluorescence intensity.

For analysis of total cell expression of KIT, cells were fixed in 4% PBS-paraformaldehyde for 15 min at 4°C before permeabilization with 5% PBS-bovine serum albumin/0.3% saponin for 15 min at room temperature, and then incubated with the phycoerythrin-conjugated anti-KIT antibody.

To inhibit KIT internalization via disruption of lipid rafts, cholesterol depletion of cell membranes was done using methyl- $\beta$ -cyclodextrin

(Sigma-Aldrich). Cells were serum-starved for 30 min, then incubated for 30 min with 30 mmol/L of methyl- $\beta$ -cyclodextrin in DMEM without serum, and finally stimulated or not by 100 ng/mL of rhSCF for 20 min before staining with phycoerythrin-conjugated anti-KIT antibody.

**Immunocytochemistry and confocal microscopy in NIH3T3-infected cells.** Immunocytochemistry of NIH3T3-infected cells was done on pellets previously embedded with Shandon Cytoblock Cell Preparation System (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Dewaxed paraffin sections were stained with anti-KIT antibody (Dako) and revealed by the Ultra View DAB Detection Kit (Ventana Medical System). Slides were observed at  $\times 100$  original magnification with Axioskop microscope (Zeiss), and then representative photographs were taken using Nikon Cool Pix camera (Nikon).

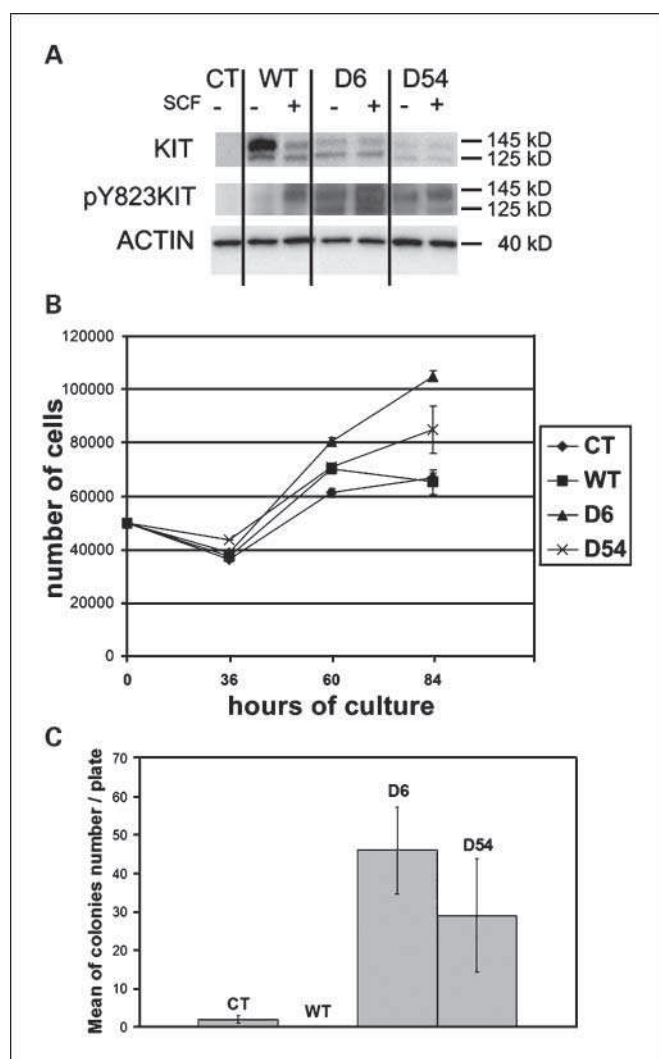
For confocal microscopy, cells were cultivated for 24 h onto polylysine-coated slides before fixation with 4% paraformaldehyde in PBS. Cells were then permeabilized with 0.1% Triton X-100, then stained with either anti-KIT, anti-pY703KIT, or anti-pY823 (revealed with anti-rabbit biotin plus streptavidin-Alexa 594), and/or with either anti-Golgin58K (revealed with anti-mouse IGG1 Alexa 647) or with rabbit anti-calnexin (revealed with anti-rabbit Alexa 647). Before incubation with anti-calnexin antibody, KIT or pY703 staining was fixed and blocked to avoid cross-binding with the other anti-rabbit antibody. Slides were mounted with Vectashield Hard-Set containing 4',6-diamidino-2-phenylindole for nuclear staining (Vector Laboratories/AbCys). Representative photographs were taken at original magnification ( $\times 63$ ) with a Leica microscope TCS SP2. Colocalization analyses were done with WCIF ImageJ software<sup>8</sup> according to the approach of Costes et al. (27).

**Statistical analysis.** For proliferation assays, the mean triplicate counts were compared among the different infected cell types using Student's *t* test. All data are expressed as mean  $\pm$  SD. The relevance of Golgi-like staining in GISTs was calculated with a  $\chi^2$  test.

## Results

**Perinuclear expression of KIT in GISTs.** Cellular localization of KIT has previously been shown to be heterogeneous in GISTs, with either plasma membrane, diffuse cytoplasmic, and/or paranuclear dot-like patterns (i.e., "Golgi-like"). The slides of all GIST cases that were diagnosed with homozygous *KIT* mutations ( $n = 17$ ) were compared with those of KIT-positive GISTs without *KIT* mutations ( $n = 14$ ), and those of 51 GISTs with heterozygous *KIT* mutations (three times the number of cases with homozygous mutations, randomly chosen in our series; Table 1). We observed 11 of 51 point mutations, 3 of 51 insertions, and 37 of 51 deletions in the heterozygous group, and 16 of 17 exon 11 deletions (Fig. 1A) and 1 of 17 exon 9 insertions in the homozygous group. KIT was expressed (Fig. 1B) in the cytoplasm of 14 cases (82%) with homozygous mutations, 10 cases (71%) without mutations, and 32 cases (63%) with heterozygous mutations. Plasma membrane expression of KIT was observed in 5 (29%), 9 (64%), and 31 (61%) cases from the same group, respectively, and was therefore significantly less frequent in the first group ( $P = 0.05$ ,  $\chi^2$  test). Paranuclear dot-like patterns were observed in 12 (70%), 2 (14%), and 18 (35%) cases ( $P < 0.01$ ;  $\chi^2$  test); therefore, predominantly in GISTs with homozygous mutations, as compared with wild-type GISTs and to GISTs with heterozygous mutations.

The expression and activation of KIT extracted from GIST frozen samples was then analyzed using Western blot analyses.



**Fig. 2.** Characterization of the NIH3T3-infected cell lines. *A*, the infected NIH3T3 cell lines were incubated with or without 100 ng/mL of rhSCF for 20 min and the KIT protein expression and the phosphorylation of the Tyr<sup>823</sup> residue were analyzed by Western blot.  $\beta$ -Actin expression was analyzed as loading control (CT, control; WT, wild-type *KIT*; D6, *KIT* D6; D54, *KIT* D54). *B*, the proliferation of control, wild-type, D6, and D54 NIH3T3 cell lines was compared. Cells were plated at 50,000 cells per well and then starved for 4 h before incubation with DMEM supplemented by 1% serum. After 36, 60, and 84 h of culture, the cells were harvested and counted. Points, mean of triplicate results; bars, SD. *C*, the capacity to grow in soft agar was tested for control, wild-type, D6, and D54 NIH3T3 cell lines. Cells were plated in 1 mL of 0.33% agar, over a 2 mL 0.5% agar layer. Four weeks later, the plates were stained and colonies were counted with GeneTools software. Each experiment was done in triplicate. Columns, mean number of colonies per plate; bars, SD.

<sup>8</sup> <http://www.uhnresearch.ca/wcif>

Samples from GISTs without deletions ( $n = 11$ ), with heterozygous deletions ( $n = 12$ ; two point mutations, three insertions, and six deletions in exon 11; one insertion in exon 9), or with homozygous deletions ( $n = 3$ ) of *KIT* gene were compared. The mature (145 kDa) form of KIT was phosphorylated in most of the 26 tumor samples. Importantly, the immature (125 kDa) form of KIT was also phosphorylated in GISTs with *KIT* mutations, but not (pY823) or weakly (pY703) in GISTs with wild-type *KIT* (Fig. 1C).

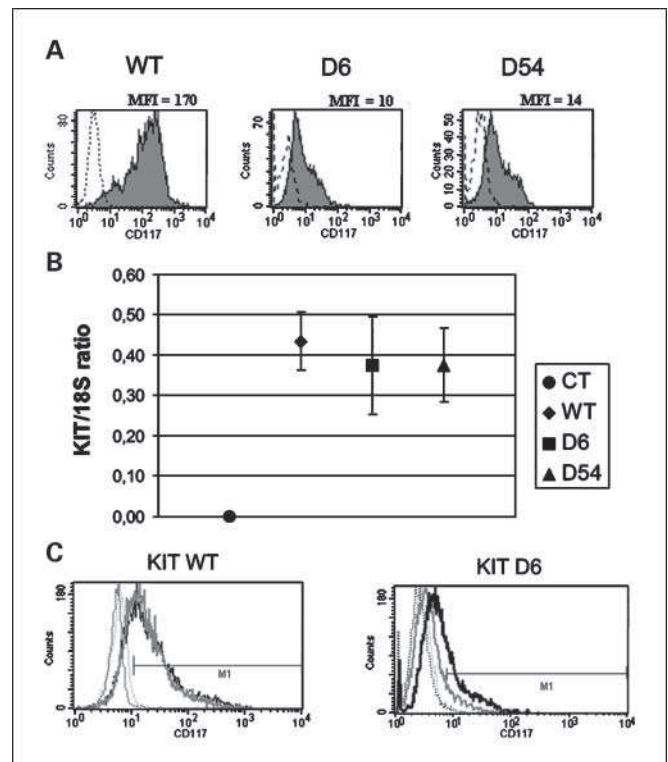
**Functional properties of NIH3T3 cells infected by human exon 11 *KIT* mutants or wild-type forms.** To evaluate the significance of the abnormal pattern of expression and activation of KIT in *KIT*-mutated GISTs, murine fibroblast cell lines (NIH3T3) were stably infected with oncoviral vectors containing either wild-type *KIT* (WT), mutated *KIT*11 DelWK557-558 (D6), or mutated *KIT*11 Del NGNYYVIDPTQPYDHK564-K581 (D54) human *KIT* cDNA, or with the empty vector (CT). The stably infected NIH3T3 cells, WT, D6, and D54 expressed the KIT protein in two forms: the mature and the immature proteins of 145 and the 125 kDa, respectively (Fig. 2A). D6 and D54 were gain-of-function mutations. Indeed, KIT was constitutively activated in cells infected with D6 and D54 oncoviral vectors, as shown by the phosphorylation of the Tyr<sup>823</sup> residue in these cells in the absence of rhSCF, whereas WT KIT activation was weak in this condition. Upon stimulation with rhSCF, WT KIT was highly phosphorylated and its expression was decreased (Fig. 2A).

The oncogenic properties of *KIT* mutants were then compared (Fig. 2B): D6 and D54 mutants proliferated significantly more than wild-type or control NIH3T3 cells after 60 and 84 hours of culture in low serum concentrations ( $P < 0.05$ ). We further tested the transforming potential of infected NIH3T3 cells by culturing them in soft agar (Fig. 2C; ref. 28). Only D6- and D54-infected NIH3T3 formed colonies in soft agar assays without the addition of rhSCF (mean<sub>[CT]</sub> = 1.00 ± 2.00; mean<sub>[WT]</sub> = 0.00 ± 0.00; mean<sub>[D6]</sub> = 45.92 ± 11.34; mean<sub>[D54]</sub> = 29.00 ± 14.66).

**Subcellular expression of *KIT* mutants and WT *KIT* in NIH3T3 cells.** Using flow cytometry, the expression of KIT in D6, D54, and wild-type infected cells was observed at the cell membrane. In the absence of rhSCF, the WT KIT receptor was expressed at a high level. The constitutively activated D6 and D54 mutants were also detectable on cell surface, albeit at reduced levels as compared with the wild-type receptor (Fig. 3A).

To get more insight into the mechanisms of reduced KIT protein expression in D6- and D54-infected cells (Figs. 2A and 3C), *KIT* mRNA expression was compared in infected cells (Fig. 3B) using real-time PCR quantification. *KIT*/18S RNA ratios were similar in wild-type and mutant infected cells (range, 0.38-0.47), and was significantly higher than in control cells (which were negative for *KIT* expression).

The overall expression (i.e., plasma membrane and intracellular) of KIT was then analyzed by flow cytometry following cellular permeabilization (Fig. 3C). Although no differences were observed between intact and permeabilized wild-type infected cells, the expression of mutant KIT protein was higher in permeabilized cells than at the cell surface. Moreover, similar to the observations made in samples from GISTs with homozygous *KIT* mutations, KIT immunochemical expression was predominantly found in the perinuclear region in NIH3T3 cells infected with the mutated *KIT* gene, whereas it remained



**Fig. 3.** KIT basal expression in NIH3T3-infected cells. **A**, membrane KIT expression without ligand stimulation in infected NIH3T3 cells lines was analyzed by flow cytometry. Histograms represent the number of cells as a function of the fluorescent intensity of KIT staining by a phycoerythrin-conjugated anti-KIT antibody. Means of fluorescence intensity (*MFI*) were compared. **B**, real-time PCR was used to quantify the expression level of *KIT* RNA in *KIT*-infected NIH3T3 cells lines (WT, D6, and D54). The noninfected NIH3T3 cells line (CT) was used for PCR-negative controls. Points, mean ratio of PCR products of *KIT*/18S RNA; bars, SD. **C**, flow cytometry analysis of permeabilized (thick black lines, KIT staining; dotted lines, isotype control staining) or non-permeabilized (thick gray lines, KIT staining; thin gray lines, isotype control) cells was done to compare total KIT or cell surface expression, respectively, in wild-type and D6-infected cells. The mean of fluorescence intensity was higher in D6 total expression than at the cell surface.

predominantly at the plasma membrane and diffusely in the cytoplasm in wild-type cells (Fig. 1B).

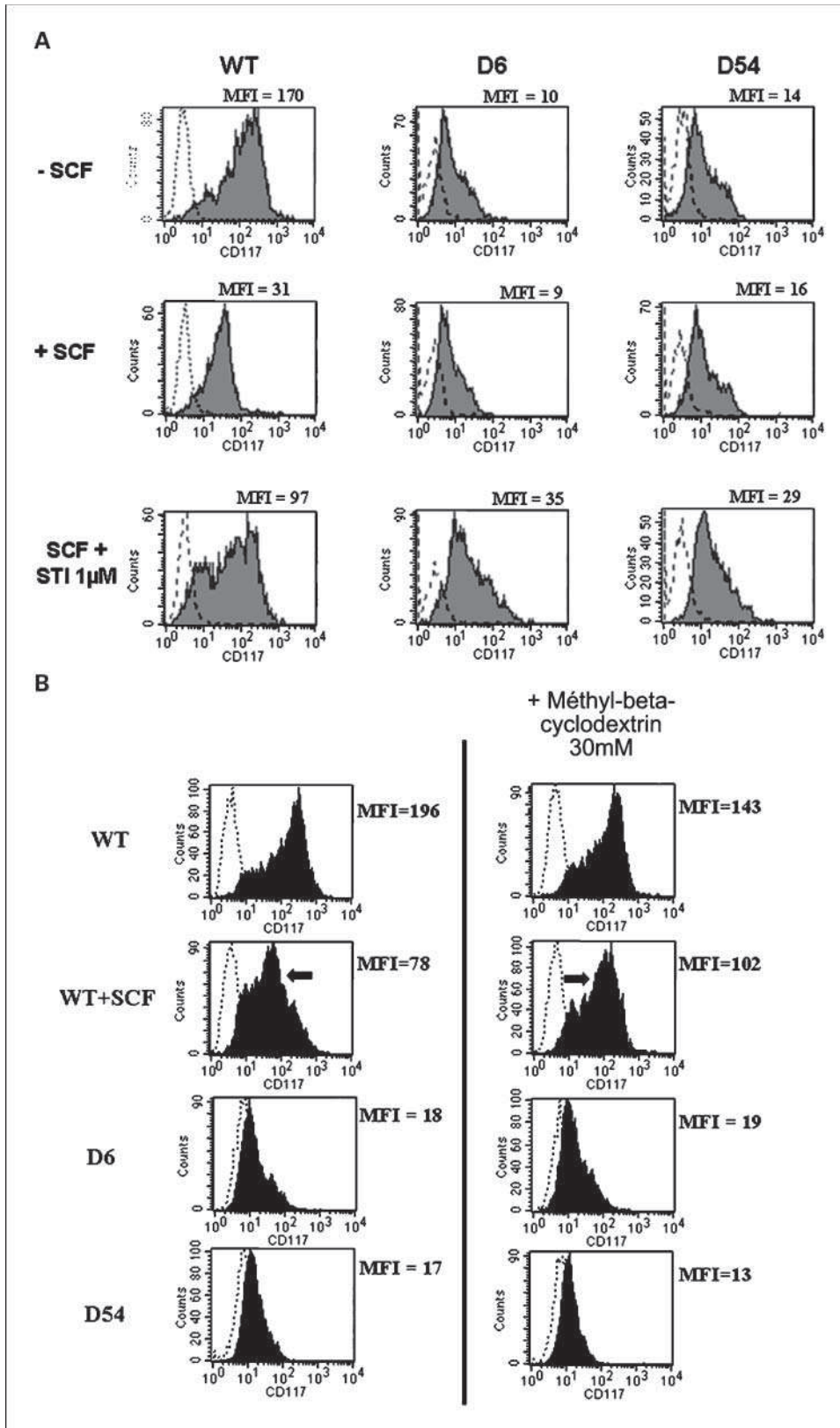
**SCF-dependent internalization and activation of *KIT* in wild-type but not in mutant-infected cells.** The cell surface expression of WT KIT was significantly decreased when WT *KIT*-infected cells were stimulated for 24 hours by rhSCF; the inhibition of KIT activation by 1 μmol/L of imatinib mainly restored the membrane expression of KIT (Fig. 4A). In constitutively activated *KIT* mutant-infected cells, additional stimulation with rhSCF did not significantly alter the membrane expression of the receptor stimulation. In contrast, the inhibition of KIT activation by imatinib, as shown further, was associated with an increased expression of the receptors at the cell surface (higher for D6 than for D54).

Methyl-β-cyclodextrin has been shown to inhibit the lipid raft pathway of KIT receptor internalization (29). Although methyl-β-cyclodextrin dramatically reduced the rhSCF-induced internalization of WT KIT, it had no effects on the surface expression of mutant KIT proteins, indicating that the weak membrane expression of the mutated KIT proteins was not due to an increased internalization (Fig. 4B).

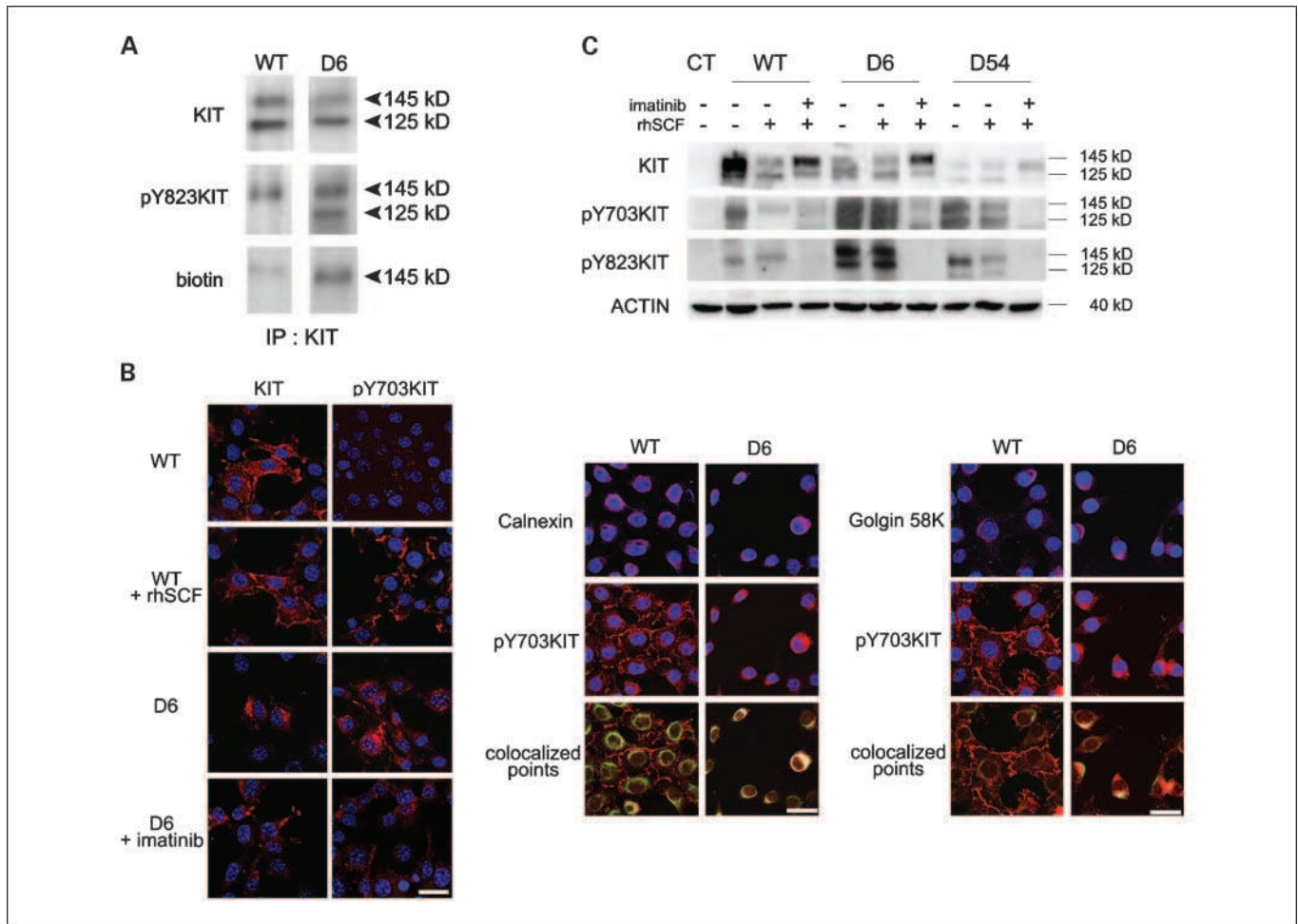
**Specific phosphorylation of the immature form of the mutated *KIT* receptor.** The 145 and 125 kDa forms of KIT differ by

glycosylation patterns (30): the 145 kDa protein corresponds to the maturation of the 125 kDa form within the Golgi apparatus, and complete maturation is requested for plasma cell membrane targeting.

To investigate whether the immature 125 kDa form was not expressed at the plasma membrane, the surface proteins of infected NIH3T3 cells were biotinylated and detected with Western blotting analysis after immunoprecipitation of both



**Fig. 4.** Regulation of KIT expression according to the kinase activity in the different infected cells. **A**, regulation of KIT cell surface expression after 24 h of stimulation by 100 ng/mL of rhSCF (SCF) and/or 1 µmol/L of imatinib (STI) was observed using flow cytometry in wild-type, D6, and D54 cells. **B**, effective KIT internalization was assessed using flow cytometry analysis of KIT cell surface expression with or without 30 mmol/L of methyl-β-cyclodextrin. Disruption of lipid raft for WT *KIT* - infected cells was followed or not by 20 min of stimulation with 100 ng/mL of rhSCF. Black arrows, modification of KIT expression under the effect of SCF with or without methyl-β-cyclodextrin.



**Fig. 5.** The immature form of KIT mutants were phosphorylated in the intracellular compartment. *A*, biotinylation of cell surface proteins was done on WT *KIT* – infected cells stimulated by 100 ng/mL of rhSCF for 20 min or on *KIT* D6 – infected cells followed by *KIT* immunoprecipitation and Western blotting. The *KIT* expression, phosphorylation of the Tyr<sup>823</sup> residue and the biotin binding, were analyzed to detect the intracellular localization and the phosphorylation of the immature form of *KIT* in D6 cells. *B*, confocal localization of *KIT* expression and activation. After permeabilization of infected WT *KIT* (stimulated for 15 min or not with rhSCF as indicated) and D6 NIH3T3 (inhibited for 1 h or not with imatinib) cell lines, the *KIT* protein and its phosphorylated form (*pY703KIT*) were revealed with the Alexa 594 fluorochrome (*red*). 4',6-Diamidino-2-phenylindole was used for nuclear coloration (*blue*). The phosphorylated form of *KIT* (*pY703KIT*; *red*) was colocalized with endoplasmic reticulum marker (*Calnexin*) or Golgi marker (*Golgin58K*) revealed with Alexa 647 fluorochrome (*magenta*). Colocalizations were highlighted using contrasting colors (*red* for *red* and *green* for *magenta*) and whitening of most fluorescent colocalized points. Bars, 9 μmol/L. *C*, effect of 24-h stimulation with 100 ng/mL of rhSCF (*SCF*) or inhibition with 1 μmol/L of imatinib on the expression and the phosphorylation (Tyr<sup>703</sup> and Tyr<sup>823</sup> residues) of the immature (125 kDa) and mature (145 kDa) forms of *KIT* using Western blot analysis. β-Actin expression was analyzed as a loading control.

immature and mature forms of *KIT* (Fig. 5A): only the mature 145 kDa form was expressed at the cell surface, whereas the intracellular immature 125 kDa form of the mutated *KIT*, which was phosphorylated on the Tyr<sup>703</sup> (data not shown) and the Tyr<sup>823</sup> residues, was retained intracellularly.

Confocal microscopy confirmed the intracellular localization of the mutant *KIT* (Fig. 5B). Indeed, phosphorylated Tyr<sup>703</sup> (Fig. 5B) and Tyr<sup>823</sup> (data not shown) of *KIT* mutants were colocalized with the endoplasmic reticulum (as shown by coexpression of the specific calnexin) and Golgi apparatus (as shown by the coexpression of the specific Golgin58K) compartments.

The relation between activation and expression of mature and immature forms of *KIT* in NIH3T3 cells was then investigated using Western blotting. Both mature and immature forms of mutant *KIT* were phosphorylated on Tyr<sup>703</sup> or Tyr<sup>823</sup> residues (Figs. 2A, 5A and C). Their stimulation by rhSCF did not alter mature or immature form of *KIT* expression (Fig. 5C).

In contrast, prolonged inhibition of these mutants with 1 μmol/L of imatinib increased the expression of the mature form (Fig. 5C), and reduced the expression of the immature form, resulting in a pattern of *KIT* expression which is similar to unstimulated WT *KIT*. As we observed in the previous experiments, only the mature 145 kDa form of WT *KIT* was phosphorylated after rhSCF stimulation (Figs. 2A and 5A). Moreover, its activation was transient, as phosphorylation of Tyr<sup>703</sup> and Tyr<sup>823</sup> was weak after 24 hours of rhSCF stimulation (Fig. 5C). The prolonged stimulation also reduced the mature WT *KIT* form expression, but did not alter the expression of the immature form. Finally, the expression of the mature form was restored upon further addition of 1 μmol/L of imatinib (Fig. 5C).

### Discussion

In the present work, we show that an immature form of GIST-type mutated *KIT*, but not of wild-type *KIT*, is activated

and undergoes an abnormal subcellular trafficking in GISTs and in *KIT*-infected NIH3T3 cells.

In-frame deletions within exon 11 (especially codons 557-558) of *KIT* are present in more than half of GISTs (5, 9-13) and result in constitutive activation of *KIT* in these human tumors (3). Gain-of-function mutations are a major event in GIST oncogenesis, as shown by the high incidence of GISTs in patients with inherited *KIT* mutations (31-33), in transgenic mice (34, 35), and in studies reporting the major antitumor effects of treatments with the *KIT* inhibitor imatinib (8). Two forms of *KIT* protein are described in GISTs (4): the 125 kDa form is a precursor of the 145 kDa form (36) and lacks the complex glycosylation necessary for its cell surface targeting (30, 37). In accordance with the data reported in the literature, we found that *KIT* was activated in most of our GIST samples, as shown by phosphorylation of the mature (145 kDa) form of *KIT*. The results here further indicate that samples with homozygous *KIT* or heterozygous mutations on exon 11 (as well as one with exon 9), also presented an activation of the immature (125 kDa) form. These observations are consistent with the report of Duensing et al. who also observed the phosphorylation of the 125 kDa *KIT* form in some primary GISTs (38). Interestingly, in GISTs with *KIT* homozygous mutations, we observed a predominant paranuclear dot pattern of *KIT* on immunohistochemical staining, as compared with GISTs without mutations ( $P < 0.01$ ) and those with heterozygous mutations ( $P = 0.01$ ). Immunohistochemical features of *KIT* expression described in GISTs are variable: it can be diffuse or dot-like within the cytoplasm, as well as in the plasma membrane (22). The mechanisms underlying these observations were not known. Pauls et al. have observed that dot-like staining (also called "Golgi pattern") of *KIT* was very frequently associated with mutations within the *KIT* gene (39). To evaluate the significance of the abnormal pattern of *KIT* expression and activation in *KIT*-mutated GISTs, we further investigated the *KIT* expression and maturation in NIH3T3-infected cells expressing either the wild-type or the juxtamembrane-mutated forms of human *KIT*.

The results we obtained with the NIH3T3 fibroblasts infected with WT *KIT* oncoviral vector are consistent with other models published until now. As in GISTs, the two forms of *KIT* were detected in NIH3T3-infected cells. The mature form of WT *KIT*, infected in NIH3T3 cells, was predominant and mainly expressed at the cell surface. Its activation with rhSCF resulted in the phosphorylation of the mature form but not the immature one. In fact, SCF stimulation of wild-type *KIT* receptor induces dimerization and activation of the mature (145 kDa) form but not of the immature (125 kDa) form (36). Moreover, previous studies have shown that the 125 kDa form is intracytoplasmic, retained within the endoplasmic reticulum or the Golgi compartments (30, 37). Finally, as already suggested by cholesterol depletion experiments (40), the internalization of the mature activated WT *KIT* form was shown to be lipid raft-dependent.

In contrast to the wild-type *KIT*, which was mainly expressed at the cell surface as a mature 145 kDa form, the mutated form was predominantly expressed within the endoplasmic reticulum and the Golgi compartments as the immature (125 kDa) form. As for GIST samples, activation of the immature form was exclusively detected in mutants. Several groups have also transfected murine cell lines with human *KIT* containing

gain-of-function mutations. The 125 kDa form was either predominantly expressed (41, 42), as in the present study and in two others with deletion or mutation of codon 559, or was the only detected form as in two models with activating mutations of codon 816 (30, 37). Phosphorylation of the immature form in murine cell lines transfected by mutated but not wild-type alleles of *KIT* has also been observed by others (30, 42, 43). Debiec-Rychter et al. used cell lines transfected with a *KIT* mutant containing a deletion of codons 557 to 558, such as in the D6 model of the present work, but additionally associated with a mutation in exon 13 (T670I). They observed that the 125 kDa form was highly expressed and also slightly phosphorylated (44).

Several lines of evidence strongly suggest that the immature 125 kDa *KIT* protein plays an essential oncogenic role in NIH3T3 and in GIST, bypassing the normal posttranslational maturation and trafficking. First, the cell membrane expression of *KIT* was weaker in *KIT* mutant compared with WT *KIT*-infected cells, whereas *KIT* mRNA expression was similar in the two cases. This was not due to a higher internalization of the receptor induced by *KIT* autoactivation because assays of lipid raft disruption did not increase *KIT* expression at the cell surface. Furthermore, the immature 125 kDa form of *KIT*, although expressed under an activated form, was not found at the cell surface using a biotinylation assay. Finally, mutant *KIT* was predominantly expressed in the endoplasmic reticulum and Golgi compartments in an activated form using confocal microscopy. Using this model, we also showed that inhibition of *KIT* kinase activity with imatinib blocked mutant *KIT* phosphorylation, restored normal maturation of these proteins, and enabled its migration in the mature form to the cell surface, showing that abnormal maturation and trafficking of the mutated *KIT* protein was a result of its constitutive activation. Taken together, these data might suggest that activating mutations lead to a premature phosphorylation of *KIT* resulting in a premature regulation of the protein that decreases its cell surface expression. Furthermore, alteration of signaling pathways, often observed in GIST models (38, 43), might be a consequence of the endoplasmic reticulum/Golgi localization as it has been reported for the *KIT* kinase domain mutant (30) and needs to be further investigated.

Gain-of-function mutations of tyrosine kinase receptors have been shown to be major events in many human tumors (for review, see ref. 45). Here, we showed that gain-of-function mutations of *KIT* not only induced an autoactivation of the receptor, but also resulted in a blockade of normal *KIT* maturation and intracellular trafficking that resulted in an abnormal activation of its intracellular immature form. Similar results were recently published with the kinase domain mutant frequently found in mastocytosis, however, its relevance in the *in vivo* situation has not yet been shown (30). Moreover, abnormal maturation and trafficking of tyrosine kinase receptors has also been observed in other tyrosine kinase receptors such as CSFR1 (46) and Flt3, which have been related to its tyrosine kinase activity (47). Interestingly, we observed that the *KIT* inhibitor imatinib partially relieved this blockade and restored *KIT* expression at the cell surface, suggesting that the constitutional activation of mutated *KIT* is responsible for the intracellular retention of the protein. Moreover, we previously showed that SCF was detectable in most GISTs, and might therefore contribute to its activation (48). Several

tyrosine kinase inhibitors are currently used to treat patients with cancer, and belong to two main types: antibodies directed against surface receptors and small specific inhibitors. The combination of both types of tyrosine kinase receptor inhibitors, as it has been suggested to target epidermal growth factor receptor in lung cancer (49, 50), may be active in both normal and bypass pathways.

These findings could have important implications in the understanding of the biology of mutant KIT receptor and for the selection of patients for targeted therapies. Mutant KIT receptor was activated within intracellular compartments of the cell, and thus, might escape the physiologic mechanisms of deactivation following ligand binding. Imatinib blocks this phenomenon, restoring normal cell membrane expression of a nonactivated immature form of the receptor. These observa-

tions may account for the lack of correlation between KIT expression at the cell surface and response to imatinib; their possible relevance to other tyrosine kinase receptors in different tumor models and tyrosine kinase inhibitor activities also needs to be explored. They also suggest that a cell-permeable inhibitor of KIT, such as imatinib, will likely be more efficient than a non-cell-permeable molecule. Whether these observations are relevant in other models of mutated activated tyrosine kinase receptors will need to be investigated.

### Acknowledgments

We thank A. Puisieux, C. Caux, C. Menetrier Caux, I. Puisieux, M. Gobert, I. Le Mercier, and all members of "Equipe Cytokines et Cancers" and INSERM U590 for fruitful discussions; as well as J. Valladeau and CCQ (confocal microscopy) and R. Saffroy (real-time PCR) for their technical advice.

### References

- Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors—definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 2001;438:1–12.
- Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003;299:708–10.
- Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279:577–80.
- Rubin BP, Singer S, Tsao C, et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2001;61:8118–21.
- Debiec-Rychter M, Dumez H, Judson I, et al. Use of c-KIT/PDGFRα mutational analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours entered on phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer* 2004;40:689–95.
- Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003;21:4342–9.
- Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 2001;344:1052–6.
- van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, et al. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet* 2001;358:1421–3.
- Andersson J, Bummig P, Meis-Kindblom JM, et al. Gastrointestinal stromal tumors with KIT exon 11 deletions are associated with poor prognosis. *Gastroenterology* 2006;130:1573–81.
- Emile JF, Theou N, Tabone S, et al. Clinicopathologic, phenotypic, and genotypic characteristics of gastrointestinal mesenchymal tumors. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:597–605.
- Kim TW, Lee H, Kang YK, et al. Prognostic significance of c-kit mutation in localized gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10:3076–81.
- Martin J, Poveda A, Llombart-Bosch A, et al. Deletions affecting codons 557–558 of the c-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). *J Clin Oncol* 2005;23:6190–8.
- Miettinen M, Makhlof H, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before imatinib with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2006;30:477–89.
- Antonescu CR, Sommer G, Sarran L, et al. Association of KIT exon 9 mutations with nongastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2003;9:3329–37.
- Lasota J, Kocczynski J, Sarlomo-Rikala M, et al. KIT 1530ins6 mutation defines a subset of predominantly malignant gastrointestinal stromal tumors of intestinal origin. *Hum Pathol* 2003;34:1306–12.
- Ernst SI, Hubbs AE, Przygodzki RM, et al. KIT mutation portends poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Lab Invest* 1998;78:1633–6.
- Lasota J, Jasinski M, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M. Mutations in exon 11 of c-Kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. *Am J Pathol* 1999;154:53–60.
- Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, et al. Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 1999;59:4297–300.
- Wardelmann E, Losen I, Hans V, et al. Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the c-kit protooncogene is associated with metastatic behavior of gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer* 2003;106:887–95.
- Emile JF, Tabone-Eglinger S, Theou-Anton N, Lemoine A. Prognostic value of KIT exon 11 deletions in GISTs. *Gastroenterology* 2006;131:976–7.
- Debiec-Rychter M, Sciot R, Le Cesne A, et al. KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Cancer* 2006;42:1093–103.
- Hornick JL, Fletcher CD. The role of KIT in the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* 2007;38:679–87.
- Nahta R, Esteva FJ. HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions. *Clin Cancer Res* 2003;9:5078–84.
- Theou N, Tabone S, Saffroy R, et al. High expression of both mutant and wild-type alleles of c-kit in gastrointestinal stromal tumors. *Biochim Biophys Acta* 2004;1688:250–6.
- Emile JF, Lemoine A, Bienfait N, et al. Length analysis of polymerase chain reaction products: a sensitive and reliable technique for the detection of mutations in KIT exon 11 in gastrointestinal stromal tumors. *Diagn Mol Pathol* 2002;11:107–12.
- Pear WS, Miller JP, Xu L, et al. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* 1998;92:3780–92.
- Costes SV, Daelemans D, Cho EH, et al. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J* 2004;86:3993–4003.
- Copeland NG, Zelenetz AD, Cooper GM. Transformation of NIH/3T3 mouse cells by DNA of Rous sarcoma virus. *Cell* 1979;17:993–1002.
- Keller P, Simons K. Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* 1998;140:1357–67.
- Xiang Z, Kreisler F, Cain J, Colson A, Tomasson MH. Neoplasia driven by mutant c-KIT is mediated by intracellular, not plasma membrane, receptor signaling. *Mol Cell Biol* 2007;27:267–82.
- Hirota S, Nishida T, Isozaki K, et al. Familial gastrointestinal stromal tumors associated with dysphagia and novel type germline mutation of KIT gene. *Gastroenterology* 2002;122:1493–9.
- Isozaki K, Terris B, Belghiti J, et al. Germline-activating mutation in the kinase domain of KIT gene in familial gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000;157:1581–5.
- Nishida T, Hirota S, Taniguchi M, et al. Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT gene. *Nat Genet* 1998;19:323–4.
- Rubin BP, Antonescu CR, Scott-Brown JP, et al. A knock-in mouse model of gastrointestinal stromal tumor harboring kit K641E. *Cancer Res* 2005;65:6631–9.
- Sommer G, Agosti V, Ehlers I, et al. Gastrointestinal stromal tumors in a mouse model by targeted mutation of the Kit receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:6706–11.
- Blume-Jensen P, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, et al. Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. *EMBO J* 1991;10:4121–8.
- Koshimizu U, Tsujimura T, Isozaki K, et al. Wn mutation of c-kit receptor affects its post-translational processing and extracellular expression. *Oncogene* 1994;9:157–62.
- Duensing A, Medeiros F, McConarty B, et al. Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Oncogene* 2004;23:3999–4006.
- Pauls K, Merkelbach-Bruse S, Thal D, Buttner R, Wardelmann E. PDGFRα- and c-kit-mutated gastrointestinal stromal tumours (GISTs) are characterized by distinctive histological and immunohistochemical features. *Histopathology* 2005;46:166–75.
- Jahn T, Seipel P, Coutinho S, et al. Analysing c-kit internalization using a functional c-kit-EGFP chimera containing the fluorochrome within the extracellular domain. *Oncogene* 2002;21:4508–20.
- Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest* 1993;92:1736–44.

42. Vanderwinden JM, Wang D, Paternotte N, et al. Differences in signaling pathways and expression level of the phosphoinositide phosphatase SHIP1 between two oncogenic mutants of the receptor tyrosine kinase KIT. *Cell Signal* 2006;18:661–9.
43. Casteran N, De Sepulveda P, Beslu N, et al. Signal transduction by several KIT juxtamembrane domain mutations. *Oncogene* 2003;22:4710–22.
44. Debiec-Rychter M, Cools J, Dumez H, et al. Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against imatinib-resistant mutants. *Gastroenterology* 2005;128:270–9.
45. Scheijen B, Griffin JD. Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease. *Oncogene* 2002;21:3314–33.
46. Roussel MF, Downing JR, Rettenmier CW, Sherr CJ. A point mutation in the extracellular domain of the human CSF-1 receptor (c-fms proto-oncogene product) activates its transforming potential. *Cell* 1988;55:979–88.
47. Schmidt-Arras DE, Bohmer A, Markova B, et al. Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 2005;25:3690–703.
48. Theou-Anton N, Tabone S, Brouty-Boye D, et al. Co expression of SCF and KIT in gastrointestinal stromal tumours (GISTs) suggests an autocrine/paracrine mechanism. *Br J Cancer* 2006;94:1180–5.
49. Huang S, Armstrong EA, Benavente S, Chinnaiyan P, Harari PM. Dual-agent molecular targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR): combining anti-EGFR antibody with tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Res* 2004;64:5355–62.
50. Matar P, Rojo F, Cassia R, et al. Combined epidermal growth factor receptor targeting with the tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839) and the monoclonal antibody cetuximab (IMC-C225): superiority over single-agent receptor targeting. *Clin Cancer Res* 2004;10:6487–501.



# Imatinib et tumeurs solides

## *Imatinib and solid tumours*

Samia ARIFI<sup>1</sup>  
Hiba EL SAYADI<sup>2</sup>  
Armelle DUFRESNE<sup>1</sup>  
Isabelle RAY-COQUARD<sup>3</sup>  
Jérôme FAYETTE<sup>2,3</sup>  
Pierre MÉEUS<sup>3</sup>  
Dominique RANCHÈRE<sup>3</sup>  
Anne-Valérie DECOUVELAERE<sup>3</sup>  
Laurent ALBERTI<sup>2</sup>  
Séverine TABONE- EGLINGER<sup>2</sup>  
Jean-Yves BLAY<sup>1,2,3</sup>  
Philippe CASSIER<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité de jour d'oncologie médicale multidisciplinaire, pavillon E, Hôpital Edouard-Herriot, 5 place d'Arsonval, 69003 Lyon

<philippe.cassier@chu-lyon.fr>

<sup>2</sup> Unité Inserm U590,

<sup>3</sup> Département de médecine, Centre régional Léon-Bérard, 28, rue Laennec, 69008 Lyon

**Résumé.** L'imatinib (Gleevec<sup>®</sup>, Glivec<sup>®</sup>, Novartis, Bâle, Suisse) est une petite molécule inhibant la tyrosine kinase de c-abl, c-kit, et le récepteur du platelet derived growth factor (PDGFR). Initialement développée pour le traitement des leucémies myéloïdes chroniques (LMC), il a actuellement une autorisation de mise sur le marché en Europe et au Etats-Unis pour le traitement des LMC et des tumeurs stromales gastro-intestinales. Compte tenu de son activité contre c-kit et PDGFR et de son profil de tolérance remarquable, il a été « essayé » dans de nombreux types de tumeur solide, avec des résultats souvent décevants. Nous proposons ici une revue des résultats obtenus avec l'imatinib dans le traitement des tumeurs solides, y compris les tumeurs stromales gastro-intestinales. ▲

**Mots clés :** imatinib, GIST, tumeur solide, KIT, PDGFR, tyrosine kinase

**Abstract.** *Imatinib mesylate (Gleevec<sup>®</sup>, Glivec<sup>®</sup>, Novartis, Basel, Switzerland) is a small molecule inhibitor of the tyrosine kinase c-abl, c-kit and the platelet derived growth factor receptor (PDGFR). Imatinib was developed for the treatment of chronic myeloid leukaemia (CML) but was approved both in Europe and the US for the treatment of CML and gastrointestinal stromal tumors (GIST). Given its activity against both c-kit and PDGFR kinases and its remarkable safety profile, imatinib has been « tried » in several solid tumors ; results however have often been deceiving. We review the current data regarding the activity of imatinib in solid tumors, including GIST. ▲*

**Key words:** imatinib, GIST, solid tumour, KIT, PDGFR, tyrosine kinase

Un peu plus de 6 ans après son autorisation de mise sur le marché par la Food and Drug Administration (FDA) (21 mai 2001), pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC), l'imatinib (Glivec<sup>®</sup>, Novartis, Bâle, Suisse) constitue un modèle de développement des thérapeutiques moléculaires ciblées et reste à ce jour l'une des molécules anticancéreuses les plus efficaces, à défaut d'être omnipotente. Développé comme un inhibiteur de la tyrosine-kinase de la protéine de fusion Bcr-Abl, l'imatinib inhibe aussi les tyrosine kinases de c-Kit, le récepteur du *stem cell factor* (SCF), et du récepteur du *platelet-derived growth factor* (PDGFR). De ces propriétés découlent des applications en oncologie des tumeurs solides, dont l'utilisation dans le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST).

## Généralités

### Structure et développement

L'imatinib est une petite molécule hydrosoluble ayant une bonne biodisponibilité orale. L'idée initiale était de développer

un inhibiteur spécifique de la kinase Abl. A la fin des années 1980, les chercheurs de Ciba-Geigy (maintenant Novartis), au sein d'un projet plus large de développement de molécules inhibitrices de protéine-kinase, ont identifié le noyau 2-phénylaminopyrimidine comme un composé de départ potentiellement intéressant, malgré sa faible spécificité (activité inhibitrice sur les sérine-thréonines et les tyrosine-kinases) et sa faible efficacité. L'ajout d'un groupement pyridyl en 3' du noyau pyrimidine, d'un groupement benzamide et d'un groupement méthyl en position 6 de l'anneau anilino-phényl a permis respectivement d'augmenter l'activité inhibitrice de kinase de la molécule, notamment vis-à-vis des tyrosine-kinases, et de supprimer l'activité sur les sérine-thréonine-kinases (figure 1). Les études *in vitro* puis *in vivo* sur des modèles de xénogreffes ont permis de montrer que l'imatinib inhibait spécifiquement les kinases Abl (toutes les formes), la tyrosine-kinase du récepteur au *platelet derived growth factor* (PDGF) et la kinase du récepteur du *stem cell factor* (SCF), c-KIT [1]. Du point de vue moléculaire, il inhibe de façon compétitive la fixation de l'adénosine triphosphate (ATP) au niveau du site catalytique de la protéine-kinase Abl [2].

### Cibles : BCR-ABL, Kit et PDGFR

BCR-ABL est le produit de la fusion du gène ABL (homologue humain du gène murin *Abelson murine leukemia*) et BCR

Tirés à part : P. Cassier

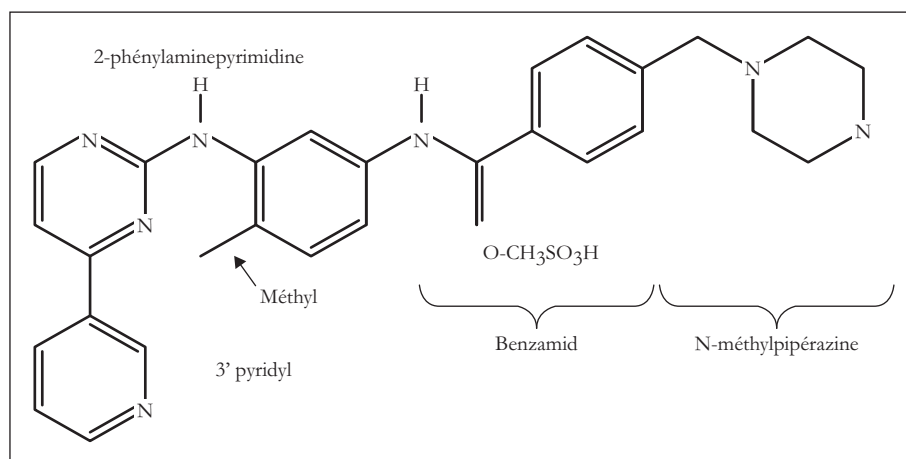


Figure 1. Structure biochimique de l'imatinib.

(*break-point cluster region*) par la translocation t(9-22) (chromosome Philadelphie) dans la leucémie myéloïde chronique (LMC). Son poids moléculaire varie de 185 à 230 kDa en fonction du site de cassure de BCR ; la forme la plus fréquente dans les LMC fait 210 kDa (environ 95 %). *c-abl*, l'homologue cellulaire de l'oncogène viral murin *v-abl*, code pour une tyrosine-kinase intracellulaire. Les fonctions de *c-abl* sont normalement étroitement régulées et cette protéine navigue entre le cytosol et le noyau, alors que les protéines de fusion *bcr-abl* sont exclusivement cytosoliques et ont une activité tyrosine-kinase constitutionnelle qui joue un rôle majeur dans leurs propriétés transformantes [3].

c-Kit est un récepteur à activité tyrosine-kinase de 145 kDa, dont le ligand est le *stem cell factor* (SCF). Il est normalement exprimé par les mastocytes, les cellules souches hématopoïétiques, les cellules germinales, les mélanocytes et les cellules interstitielles de Cajal. Il joue un rôle important dans la différenciation et la croissance de ces cellules. Différents types d'anomalie moléculaire (délétions, mutations ponctuelles, insertions) peuvent être responsables d'une activation constitutive de kit. L'activation permanente de la tyrosine-kinase de kit entraîne une stimulation mitogénique en l'absence de ligand [4]. En dépit de son expression dans plusieurs types tumoraux – GIST (95 %), carcinome thymique (86 %) séminomes (84 %), oncocytome (80 %), carcinome chromophile (45 %), carcinome adénoïde kystique salivaire (77 %), les mélanomes (36 %), carcinomes folliculaires de la thyroïde (23 %) [5] – la contribution de c-kit dans la transformation maligne n'est établie que pour les GIST, ce qui explique que les thérapeutiques ciblant Kit soient en général inopérantes en dehors des GIST.

Le récepteur du *platelet derived growth factor* (PDGFR), troisième cible de l'imatinib, est un récepteur à activité tyrosine-kinase dont le ligand est le *platelet derived growth factor* (PDGF). Ce récepteur existe sous deux formes de forte homologie de structure : PDGFR $\alpha$  et PDGFR $\beta$ . Il est normalement exprimé par les cellules du tissu de soutien, il joue un rôle dans le développement embryonnaire et la cicatrisation tissulaire [6]. Son rôle dans la tumorigenèse de certains cancers est actuellement bien documenté. Ces mécanismes correspondent à des boucles autocrines et/ou paracrines d'activation (glioblastome, dermatofibrosarcome protuberans) impliquant le PDGF ou à une activité kinase constitutive secondaire à une altération moléculaire du gène du PDGFR

(certaines GIST, leucémie myélonocyttaire chronique) [6]. Le PDGFR joue aussi un rôle important dans la régulation de l'angiogenèse par le biais des péricytes qui l'expriment, ce qui semble influencer la pression interstitielle au sein des tissus, y compris tumoraux [6, 7]. Le ciblage du PDGFR peut de ce fait correspondre au ciblage d'une anomalie causale et/ou du micro-environnement tumoral.

## Le modèle, les Gist

Les GIST sont des tumeurs mésenchymateuses du tube digestif. Elles trouveraient leur origine dans les cellules interstitielles de Cajal qui jouent un rôle clé dans la motricité automatique du tube digestif. Leur fréquence est estimée à environ 12 cas pour 10<sup>6</sup> habitants en France [8] et dans d'autres pays d'Europe [9]. De nombreuses revues de la littérature sur le rôle de l'imatinib dans leur traitement ont été publiées, y compris en français [10, 11] et peuvent être consultées pour plus de détails.

Sur le plan anatomopathologique, ces tumeurs se présentent sous la forme d'une prolifération de cellules fusiformes et/ou épithélioïdes avec, dans plus de 95 % des cas, un marquage membranaire par l'anticorps anti-CD117 en immunohistochimie. Cet anticorps reconnaît la protéine c-Kit, récepteur membranaire du SCF, facteur de croissance hématopoïétique. Sa positivité est d'ailleurs considérée comme pathognomonique mais manque malgré tout de spécificité. L'expression de c-Kit à la surface de la quasi-totalité des GIST a attiré, notamment du fait qu'il s'agit d'un potentiel oncogène [8, 12], l'attention scientifique sur le rôle exact de cette protéine dans la physiopathologie de ces tumeurs. Ainsi, en 1998, ont été identifiées des mutations activatrices de c-Kit, donnant à la protéine une conformation constitutionnellement activée, indépendante de son ligand [13]. Ces mutations, identifiées dans 5 GIST, concernaient toutes l'exon 11, codant pour la portion juxtamembranaire intracellulaire du récepteur. D'autres études ont montré que les mutations activatrices de Kit étaient une caractéristique ubiquitaire des GIST, puisqu'elles étaient retrouvées dans près de 90 % des cas et qu'elles pouvaient intéresser d'autres portions de la protéine, notamment l'exon 9 [14] et beaucoup plus rarement les exons 13 et 17 [4].

D'authentiques GIST kit-négatives existent, certaines d'entre elles présentent des mutations de kit ; elles pourraient avoir

**Tableau 1.** Taux de réponse objectives (RO) et de SD des tumeurs stromales gastro-intestinales à l'imatinib dans les différents essais

Etude	Effectif	Dose	RO	SD
EORTC phase I Van Oosterom <i>et al.</i> 2001	36	400/1 000 mg	56 %	36 %
US B2222 phase II	73	400 mg	50 %	23 %
Demetri <i>et al.</i> 2002	74	600 mg	58 %	18 %
EORTC phase II Verweij <i>et al.</i> 2003	27	800 mg	70 %	18 %
EORTC phase III Verweij <i>et al.</i> 2004	463	400 mg	50 %	32 %
	462	800 mg	51 %	31 %
Intergroup S00333	373	400 mg	43 %	32 %
Rankin <i>et al.</i> 2004	373	800 mg	41 %	32 %

perdu l'expression de la protéine au cours de leur évolution, d'autres ont un gène kit dit sauvage ou *wild type* (WT). Un travail du groupe de Fletcher s'est intéressé à ces tumeurs qui n'ont ni surexpression, ni mutation de kit. Ils ont recherché dans ces tumeurs la surexpression d'un autre récepteur à activité tyrosine kinase. Ils ont pour cela immunoprécipité toutes les tyrosine-kinases dans les lysats de tumeurs kit WT par un anticorps pan-récepteur tyrosine-kinase [15] ; c'est ainsi qu'ils ont observé une forte surexpression du récepteur alpha au PDGF.

Des mutations du PGDFRA ont été mises en évidence par la suite. Elles concernent 35 à 67 % des GIST kit WT, soit 5 à 7 % de toutes les GIST. Elles siègent essentiellement au niveau des exons 18, 12 et 14 [16], et sont responsables d'une activation constitutionnelle du récepteur.

Le domaine tyrosine-kinase des protéines c-kit et PDGFR sont structurellement très proches de la protéine de fusion abl-bcr et l'imatinib inhibe l'activité tyrosine-kinase kit et PDGFR *in vitro* [17]. L'inhibition des formes mutées de kit par l'imatinib a été par la suite confirmée par des études *in vitro* sur une lignée cellulaire humaine, établie à partir de GIST (GIST882) portant une mutation activatrice de KIT (K642) [18].

L'efficacité clinique de l'imatinib dans le traitement des GIST a d'abord été suggérée par les résultats spectaculaires rapportés dans une observation de tumeur stromale digestive métastatique [19], puis elle a été confirmée dans le cadre de plusieurs essais cliniques (tableau 1) [20-24]. Les premières études de phases I puis II et III évaluant l'efficacité de l'imatinib dans le traitement des GIST en phases avancée et métastatique ont été publiées en 2002 et l'autorisation de mise sur le marché dans cette indication a été obtenue en février 2002 aux Etats-Unis et en juin 2002 en France.

L'indication de l'imatinib dans les GIST localement avancées ou métastatiques est actuellement bien établie ; en revanche, son bénéfice en traitement adjuvant et néoadjuvant à la chirurgie est en cours d'évaluation [25]. Les résultats préliminaires de l'étude de l'American College of Surgeons Oncology Group (Acosog) Z9001, présentés par DeMatteo *et al.* au congrès de l'American Society of Clinical Oncology (Asco) 2007, ont montré une amélioration significative de la survie sans rechute à 1 an (qui passe de 83 à 97 %) pour les patients traités par imatinib 400 mg/j pendant 1 an après résection complète d'une GIST de taille supérieure ou égale à 3 cm [26]. Cependant, ces données ne sont pas encore suffisamment matures pour estimer le bénéfice sur la survie et aucune donnée actuelle ne justifie l'utilisation de l'imatinib en situation adjuvante. Notamment les données de l'essai de phase III du groupe Sarcome français BFR14 qui comparait, chez des

patients pour la plupart métastatiques et répondeurs (réponses complète, partielle et maladie stable), poursuite *versus* interruption de l'imatinib après 1 et 3 ans de traitement, ont montré que la rechute était inexorable après arrêt de l'imatinib, y compris chez les patients en réponse complète [27, 28].

Le type de mutation est un élément essentiel corrélé au pronostic et à la réponse au traitement. Les données des différents essais cliniques montrent des différences significatives en termes de réponse objective, de survie sans progression et de survie globale entre les différents profils mutationnels [21, 23, 29]. Les mutations de l'exon 11 de c-kit ont une meilleure réponse à l'imatinib (taux de réponse d'environ 80 %) que les mutations de l'exon 9 (taux de réponse d'environ 50 %) ; celles des exons 13 et 17 sont responsables d'une résistance primaire à l'imatinib [15]. L'importance du type de mutation a encore été soulignée par une analyse menée sur la survie sans progression des patients inclus dans l'essai EORTC 62005 qui comparait deux doses d'imatinib (400 *versus* 800 mg/j). Dans cette étude, le taux de réponse global et la survie sans progression étaient similaires dans les deux bras (tableau 1). Cependant, une analyse rétrospective des données corrélées au type de mutation de KIT a montré que, si les patients qui présentent une tumeur avec mutation de l'exon 11 ne bénéficient pas de l'augmentation de dose à 800 mg/j, il n'en va pas de même des patients dont la tumeur porte une mutation de l'exon 9 : dans ce sous-groupe, l'augmentation de dose de 400 à 800 mg/j s'accompagne d'un allongement significatif de la survie sans progression [29]. Ces données ont été récemment confirmées par l'étude MétaGIST présentée par Martine Van Glabbeke au congrès de l'Asco 2007 [30]. Si l'imatinib constitue le traitement de choix des patients souffrant d'une GIST métastatique ou avancée, tous les patients ne répondent malheureusement pas et ceux qui répondent finissent par re-progresser au cours de l'histoire de leur maladie. Les résistances peuvent être primaires (10 à 15 % des cas) [20, 21], suite à une résistance intrinsèque de la cible (KIT WT, certaines mutations du PDGFR, amplification de la cible), ou secondaires (50 % des patients) [20, 21] expliquée par l'acquisition de nouvelles mutations ou par l'apparition d'une anomalie moléculaire située en aval de c-kit sur la voie de signalisation [31].

## L'autre modèle, les dermatofibrosarcomes de Darier-Ferrand

Les dermatofibrosarcomes de Darier-Ferrand, appelées dermatofibrosarcomes protuberans par les Anglo-saxons (DFSP),

**Tableau 2.** Réponse à l'imatinib des cas de dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand rapporté dans la littérature

Auteurs	Effectif	Stade	Dose d'imatinib	Réponse
Rubin <i>et al.</i> 2002	1 cas	Métastatique	800 mg	RC
Maki <i>et al.</i> 2002	2 cas	Métastatique	400 mg	RP
Baars <i>et al.</i> 2003	1 cas	Métastatique	-	RP
Mizutani <i>et al.</i> 2004	1 cas	Métastatique	400 mg	RP
Labropoulos <i>et al.</i> 2005	1 cas	Métastatique	400 mg	RC
McArthur <i>et al.</i> 2005	10 cas	2 méta + 8 RL	800 mg	4 RC + 5 RP
Kasper <i>et al.</i> 2006	1 cas	Métastatique	400 puis 800 mg	RC
Mehrany <i>et al.</i> 2006	1 cas	-	-	RP

Méta : métastase ; RL : récurrence locale ; RC : rémission complète ; RP : rémission partielle.

sont des sarcomes cutanés de malignité intermédiaire, caractérisés par une forte agressivité locale et un potentiel métastatique réel mais faible : 5 % des patients auront une évolution métastatique malgré une chirurgie optimale [32].

Les DFSP sont caractérisées par une translocation spécifique entre le chromosome 17 et le chromosome 22:t(17;22)(q22;q13), qui met le gène de PDGF $\beta$  sous le contrôle du promoteur du gène COL1A1 $\alpha$  (codant pour le collagène 1 $\alpha$ , protéine structurelle de la matrice extracellulaire du tissu conjonctif), cette translocation engendre une élimination de l'exon 1 du PDGF $\beta$ , qui normalement rétrocontrôle négativement l'expression de la protéine, ce qui entraîne une surexpression du PDGF $\beta$ . La protéine chimérique qui en résulte COL1A1-PDGF $\beta$  (collagène I,  $\alpha$ 1 polypeptide) se lie au récepteur PDGFR $\beta$  et est responsable d'une stimulation mitogénique, créant ainsi une boucle autocrine d'activation [6, 33]. Cette translocation serait à l'origine de la transformation maligne dans cette pathologie. La caractérisation moléculaire des DFSP a des conséquences diagnostiques et, surtout, thérapeutiques. Des études *in vitro* testant l'activité antitumorale de l'imatinib (inhibiteur du PDGFR) ont montré une régression de la prolifération en présence de celui-ci [33, 34].

Plusieurs cas de DFSP non résectables et/ou métastatiques traités par imatinib ont été rapportés dans la littérature (*tableau 2*) [34-41]. L'imatinib a été utilisé à des doses de 400 ou de 800 mg/j. Dans la plus grande série comprenant 10 cas de DFSP [34], 5 patients ont eu une réponse complète et 4 une réponse partielle. Parmi ces 10 patients, 8 avaient une récurrence locale porteuse de la t(17;22) et 2 une rechute métastatique, la tumeur de l'un de ces deux patients n'avait pas la t(17;22) et n'a pas répondu au traitement. Ces données confirment *in vivo* que le PDGFR est bien la cible de l'imatinib dans les DFSP et que seules les tumeurs présentant la translocation t(17;22) répondent. La preuve conceptuelle étant faite, il reste à définir le rôle exact de l'imatinib dans la prise en charge des

DFSP, et notamment son rôle potentiel en situation préopératoire pour les tumeurs non résectables d'emblée.

## Traitement des autres tumeurs solides

### Tumeurs germinales

Le récepteur membranaire c-kit est normalement exprimé par les cellules germinales primitives. Son expression dans les tumeurs germinales testiculaires est caractéristique des séminomes [42]. Des mutations somatiques de c-kit ont été identifiées. Elles portent principalement sur l'exon 17 et beaucoup plus rarement sur l'exon 11 (*tableau 3*) [43-47]. Elles confèrent à la protéine une activité tyrosine-kinase constitutive [47]. L'analyse des voies de signalisation sous-jacentes montre que les mutants de kit activent, indépendamment de leur ligand, la voie de PI3K-Akt [44, 45]. Cependant, le rôle de c-kit dans l'induction ou dans la progression des tumeurs germinales testiculaire reste à établir. La diminution ou la perte d'expression de kit serait liée à une évolution plus agressive ou à une progression vers une forme non séminomateuse [42, 44, 48]. Les inhibiteurs de la tyrosine-kinase de kit pourraient donc jouer un rôle dans le traitement des séminomes. Dans ce contexte, l'imatinib a fait l'objet d'études *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux [49], puis chez l'homme. *In vitro* et dans les modèles animaux, sa sensibilité dépend du siège de la mutation. Les mutations de l'exon 17, notamment D816H et D816V qui concernent le domaine catalytique du récepteur, sont connues pour leur résistance à l'imatinib. Les résultats cliniques restent quand à eux très modestes. Le premier cas clinique de tumeur germinale testiculaire rapporté dans la littérature a progressé rapidement sous imatinib [50].

Une étude de phase II a été effectuée chez 18 patients ayant des tumeurs germinales testiculaires métastatiques réfractai-

**Tableau 3.** Mutations de c-kit retrouvées par différentes équipes dans les séminomes

Auteur	Effectif	Exon	Fréquence	Mutation
Sakuma <i>et al.</i> 2003	43	11	2,3 %	W557R
		17	11,8 %	D816H, D816V
Kemmer <i>et al.</i> 2004	54	11	0 %	-
		17	24,1 %	D816H, D816V, Y823, Y823C, N822K, T8011
Nakai <i>et al.</i> 2005	25	11	9 %	L576P $\Delta$ 57 pb (555-573)
		17	31,8 %	D816A- D816H-D816V-D820V- D816H-
Bierman <i>et al.</i> 2007	177	11	0 %	-
		17	13,5 %	D816H, D816V, Y823D, N822K
Willmore-Payne <i>et al.</i> 2007	22	11	5 %	L576P
		17	18 %	D816Y, D816V, D816E, D820H, Y823N

res à la chimiothérapie. Sur 18 patients, seuls les 6 qui avaient une tumeur exprimant kit en immunohistochimie ont été traités. L'imatinib était administré à une dose de 600 mg/j. Cinq patients sur 6 ont progressé rapidement, un seul a eu une stabilisation pendant 3 mois [51].

### Mélanomes malins

La mise en évidence de l'expression, même inconstante, de c-kit, du PDGFR et/ou d'abl dans les mélanomes malins a suscité des questions sur le rôle de ces protéines dans la transformation maligne des mélanomes et sur l'intérêt potentiel de l'imatinib dans le traitement de ce cancer. La fréquence d'expression de c-kit et du PDGFR est hétérogène et varie d'une série à l'autre. Des mutations de c-kit sont rapportées dans la littérature. Willmore-Payne *et al.* [47] ont mis en évidence une mutation ponctuelle au niveau de l'exon 11 (L576P) chez 3 patients d'une série de 153. L'analyse de ces cas par FISH a révélé une amplification du gène dans un cas, les deux autres cas sont homozygotes pour la mutation. Les auteurs font l'hypothèse que la mutation L576P n'est oncogénique que si la protéine kit est surexprimée. Eton *et al.* [52] ont décrit une délétion du codon 517 de l'exon 11 de c-kit chez un patient ayant présenté une réponse complète pendant plus d'un an, sous imatinib, administré dans le cadre d'un essai de phase II. Les résultats de deux autres études de phase II évaluant l'efficacité de l'imatinib dans les mélanomes métastatiques sont décevants : taux de réponse objective nul et médiane de survie sans progression courte (inférieure à 2 mois) [53, 54].

### Tumeurs desmoïdes ou fibromatose agressive

L'intérêt potentiel de l'imatinib dans la prise en charge des tumeurs desmoïdes repose sur les résultats encourageants des essais cliniques. En effet, dans une étude multicentrique de phase II ayant inclus 40 patients atteints de tumeurs desmoïdes prétraités et progressifs à l'inclusion, 1 réponse complète, 3 réponses partielles, 31 stabilisations et 1 décès ont été rapportés [55]. La survie sans progression à 1 an est de 71 %. Ces données ont été confirmées par les résultats d'une autre étude de phase II dans laquelle, parmi 19 patients atteints de fibromatose agressive traités par imatinib, 3 ont eu une réponse partielle et 4 une stabilisation pendant plus d'un an [31].

Les bases moléculaires de la sensibilité des tumeurs desmoïdes à l'imatinib ne sont toujours pas bien élucidées. Les données de la littérature sur l'expression de c-kit et du PDGFR par ces tumeurs sont contradictoires [56, 57]. Des mutations de c-kit ont été identifiées et portent sur l'exon 10 [55, 58, 59]. Aucune mutation du PDGFR n'a été retrouvée [31, 60].

### Cancer bronchique à petites cellules (CBPC)

La découverte d'une coexpression de c-kit et de son ligand dans des lignées de cellules de cancer bronchique à petites cellules (CBPC) fait émettre l'hypothèse d'une prolifération stimulée par une boucle autocrine [61]. Les études en immunohistochimie montrent un marquage positif au CD117 dans 25 à 50 % des cas [15]. Ces données ont fait du CBPC un candidat potentiel pour une thérapie ciblant le récepteur c-kit. Dans un modèle de xénogreffe de CBPC, l'imatinib a un effet seulement cytotatique [15]. Quatre études de phase II ont été conduites et sont rapportées dans la littérature. Toutes sont négatives, montrant un taux de réponse nul et une survie sans progression inférieure à 1 mois [62-65].

### Gliomes malins

Les glioblastomes sont caractérisés par une activation autocrine des récepteurs au PDGF [4]. L'activité de l'imatinib sur ces tumeurs a été démontrée dans des études précliniques : *in vitro* et sur des modèles de xénogreffe [4]. Des études de phase II évaluant l'efficacité de l'imatinib en association avec l'hydroxy-urée chez des patients atteints de gliome malin (glioblastome et astrocytome) récidivants ou progressifs ont montré une efficacité encourageante de cette combinaison avec un bon profil de tolérance. Les taux de réponse étaient de 10 et 20 % et la survie sans progression à 6 mois de 27 à 53 % selon les études [66-68].

### Cancers de l'ovaire

Le rationnel d'un traitement par inhibiteur de tyrosine-kinase dans le cancer de l'ovaire découle de la mise en évidence de l'expression des récepteurs c-kit, PDGFRA et/ou c-ABL dans ces tumeurs. Dans une étude rapportée par Schmandt *et al.* [69], 81 % des 83 tumeurs expriment le PDGFR $\beta$ , 71 % c-ABL et c-kit [69]. Cependant, aucune altération génétique, mutation ou amplification génique de c-kit ou du PDGFR n'a été détectée [70]. Des études *in vitro* comparant l'activité antitumorale de l'imatinib sur des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire selon qu'elles expriment ou non le PDGFR suggèrent que l'imatinib inhibe la prolifération des cellules *via* une inhibition de l'activité tyrosine-kinase du PDGFR [71]. La même étude montre qu'une activation constitutive d'AKT entraîne une résistance au ciblage du PDGFR. Dans une autre étude réalisée sur un modèle animal, l'imatinib entraîne une réduction significative de la taille de la tumeur. Dans ce modèle, les auteurs montrent qu'en plus de son action directe sur la cellule tumorale, il induit l'apoptose dans les cellules endothéliales associées à la tumeur et que l'effet antitumoral pourrait être en partie lié à un effet anti-angiogénique [72]. En pratique clinique, son efficacité reste limitée dans les cancers de l'ovaire. Dans une étude de phase II, 16 patients atteints de cancer épithélial de l'ovaire en rechute ont reçu une dose journalière d'imatinib de 600 mg. Aucune réponse objective n'a été rapportée, 4 des 12 patients évaluable ont eu une stabilisation pendant 4, 6, 7 et 8 mois [73].

### Cancers de la prostate

Dans un modèle animal de métastases osseuses de cancer de la prostate, l'imatinib a un effet antitumoral et anti-angiogénique vraisemblablement par le biais d'une inhibition du PDGFR. L'association paclitaxel et imatinib testée sur ce même modèle animal s'est montrée plus efficace qu'une monothérapie par paclitaxel. L'association chimiothérapie et imatinib dans le traitement des métastases osseuses du cancer de la prostate hormono-résistant est en cours d'évaluation en phase clinique (phase II docetaxel-imatinib).

### Tumeurs endocrines

L'imatinib s'est montré peu efficace chez les patients atteints de tumeurs endocrines. Dans une étude pilote ayant porté sur 15 patients, 6 carcinomes médullaires de la thyroïde, 4 corticosurrénales, 2 tumeurs carcinoïdes, 2 phéochromocytomes malins et une tumeur neuroendocrine, aucune réponse objective n'a été rapportée, une tumeur carcinoïde a été stabilisée pendant plus de 6 mois sous imatinib [74].

Yao *et al.* [75] ont rapporté une efficacité antitumorale de l'imatinib, *in vitro*, sur des lignées de cellules carcinomateuses bronchiques et de tumeur endocrine du pancréas. Une étude de phase II publiée par la même équipe a fait suite à ces résultats précliniques encourageants. Vingt-sept patients atteints de tumeur carcinomateuse ont été traités par imatinib 400 mg deux fois par jour. Une réponse partielle et 17 stabilisations ont été observées avec une survie sans progression de l'ordre de 6 mois.

## Tumeurs secondaires à l'imatinib

Une équipe française a rapporté un taux anormalement élevé de second cancer dans une cohorte de patients traités par imatinib pour une LMC. Dans cette étude, parmi 189 patients, 6 ont présenté un second cancer après 2 à 4 ans de traitement par imatinib ; pour 3 d'entre eux, il s'agissait d'un cancer de la prostate. L'incidence des cancers de la prostate dans leur cohorte paraissait être multipliée par 4 par rapport à celle observée en France pour les patients traités par imatinib [76]. Cette étude a été critiquée sur le plan méthodologique par Novartis dans une lettre à l'éditeur, car la comparaison des incidences portait sur une tranche d'âge trop large pour être pertinente : la fréquence des cancers de la prostate n'est en effet pas uniforme entre 40 et 69 ans [77]. Dans cette lettre, Pilot *et al.* rapportent qu'une analyse des cas de second cancer parmi les patients traités par imatinib dans le cadre d'essais cliniques et portant sur plus de 9500 patients n'a pas mis en évidence d'augmentation de l'incidence des cancers en général ni des cancers de la prostate en particulier parmi ces patients lorsque ces données d'incidence ont été comparées par tranche d'âge de 5 ans à celles du programme Statistical Epidemiology and End Results (SEER). Compte tenu de ces données, il paraît difficile de conclure à la tumorigénicité de l'imatinib chez l'homme, même si son administration prolongée semble être responsable d'une augmentation des cas de cancer du tractus urogénital chez le rat (lettre aux investigateurs utilisant l'imatinib, septembre 2004). Enfin, comme le soulignent Pilot *et al.*, compte tenu du caractère récent de ce médicament, il est important de continuer à suivre minutieusement les patients traités par imatinib afin de dépister d'éventuelles complications à long terme [77].

## Conclusion

L'imatinib constitue un modèle de thérapeutique, ciblant plusieurs protéines reconnues pour leurs propriétés oncogéniques. Sa grande efficacité dans la LMC et dans les GIST, associée à un profil de tolérance favorable, incite à l'élargissement des indications vers d'autres types de tumeur solide. Cependant, dans la grande majorité des cas, la simple expression des cibles n'est pas un critère pertinent de sélection pour un traitement par imatinib, et seules les pathologies dans lesquelles sont présentes des anomalies moléculaires de la cible (abl, kit ou PDGFR) peuvent réellement bénéficier d'un traitement par imatinib. ▼

## RÉFÉRENCES

1. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2005 ; 105 : 2640-53.

2. Savage DG, Antman KH. Imatinib mesylate : a new oral targeted therapy. *N Engl J Med* 2002 ; 346 : 683-93.

3. Mauro MJ, Druker BJ. STI571 : targeting BCR-ABL as therapy for CML. *Oncologist* 2001 ; 6 : 233-8.

4. Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2004 ; 22 : 3813-25.

5. Went PT, Dirnhofer S, Bundi M, Mirlacher M, Schraml P, Mangialaio S, *et al.* Prevalence of KIT expression in human tumors. *J Clin Oncol* 2004 ; 22 : 4514-22.

6. Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov* 2002 ; 1 : 493-502.

7. Reinmuth N, Stoeltzing O, Liu W, Ahmad SA, Jung YD, Fan F, *et al.* Endothelial survival factors as targets for antineoplastic therapy. *Cancer J* 2001 ; 7(Suppl 3) : S109-S119.

8. Monges G, Coindre J, Scoazec J, Bouvier A, Blay J, Loria-Kanza Y, *et al.* Incidence of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) in France : results of the Progist survey conducted among pathologists. *Asco Meeting Abstracts* 2007 ; 25 : 10047.

9. Nilsson B, Bummig P, Meis-Kindblom JM, Oden A, Dortok A, Gustavsson B, *et al.* Gastrointestinal stromal tumors : the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era : a population-based study in western Sweden. *Cancer* 2005 ; 103 : 821-9.

10. Ray-Coquard I, Le Cesne A, Michallet V, Boukovinas I, Ranchere D, Thiesse P, *et al.* Tumeurs stromales du tractus digestif : actualités 2003. *Bull Cancer* 2003 ; 90 : 69-76.

11. Ray-Coquard I, Saba C, Ducimetière F, Confavreux C, Rustam F, Brantus JF, *et al.* A. Traitement multidisciplinaire des tumeurs stromales gastro-intestinales : cas cliniques en situation adjuvante, néoadjuvante, avancée, en échappement. *Bull Cancer* 2006 ; 93 : S181-S189.

12. Besmer P, Murphy JE, George PC, Qiu FH, Bergold PJ, Lederman L, *et al.* A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature* 1986 ; 320 : 415-21.

13. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, *et al.* Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998 ; 279 : 577-80.

14. Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, *et al.* A. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 8118-21.

15. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, *et al.* A. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003 ; 299 : 708-10.

16. Medeiros F, Corless CL, Duensing A, Hornick JL, Oliveira AM, Heinrich MC, *et al.* KIT-negative gastrointestinal stromal tumors : proof of concept and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol* 2004 ; 28 : 889-94.

17. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, *et al.* Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000 ; 295 : 139-45.

18. Tuveson DA, Willis NA, Jacks T, Griffin JD, Singer S, Fletcher CD, *et al.* STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein : biological and clinical implications. *Oncogene* 2001 ; 20 : 5054-8.

19. Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartia P, Tuveson D, *et al.* Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 2001 ; 344 : 1052-6.

20. van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, Stroobants S, Donato DI, Paola E, *et al.* Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumors : a phase I study. *Lancet* 2001 ; 358 : 1421-3.

21. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts P, *et al.* Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002 ; 347 : 472-80.

22. Verweij J, van Oosterom A, Blay JY, Judson I, Rodenhuis S, van der Graaf W, *et al.* Imatinib mesylate (STI-571 Glivec, Gleevec) is an active agent for gastrointestinal stromal tumours, but does not yield responses in other soft-tissue sarcomas that are unselected for a molecular target. Results from an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group phase II study. *Eur J Cancer* 2003 ; 39 : 2006-11.
23. Verweij J, Casali PG, Zalcberg J, LeCesne A, Reichardt P, Blay JY, *et al.* Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib : randomised trial. *Lancet* 2004 ; 364 : 1127-34.
24. Rankin C, Von Mehren M, Blanke C, Benjamin R, Fletcher CDM, Bramwell V, *et al.* Dose effect of imatinib in patients with metastatic GIST. Phase III Sarcoma Group Study S0033. *Asco meeting abstracts* 2004 ; 22 : 9005.
25. Blay JY, Bonvalot S, Casali P, Choi H, Biac-Richter M, Dei Tos AP, *et al.* Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors. Report of the GIST Consensus Conference of 20-21 March 2004, under the auspices of Esmo. *Ann Oncol* 2005 ; 16 : 566-78.
26. DeMatteo RP, Owzar K, Maki RG, Pisters P, Blackstein M, Antonescu CR, *et al.* Adjuvant imatinib mesylate increases recurrence free survival in patients with completely resected localized primary gastrointestinal stromal tumor : North American Intergroup Phase III trial Acosog Z9001. *Asco Meeting Abstracts* 2007 ; 25 : 10079.
27. Rios M, LeCesne A, Bui B, Adenis A, Bertucci F, Duffaud F, *et al.*, and French Sarcoma Group. Interruption of imatinib in GIST patients with advanced disease after one year of treatment : updated results of the prospective French Sarcoma Group randomized phase III trial on long term survival. *Asco meeting abstracts* 2007 ; 25 : 10016.
28. Le Cesne A, Ray-Coquard I, Bui B, Rios M, Adenis A, Bertucci F, *et al.* Continuous versus interruption of imatinib in responding patients with advanced GIST after three years of treatment : A prospective randomized phase III trial of the French Sarcoma Group. *Asco Meeting Abstracts* 2007 ; 25 : 10005.
29. Debiec-Rychter M, Scior R, Le Cesne A, Schlemmer M, Hohenberger P, van Oosterom A, *et al.* KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Cancer* 2006 ; 42 : 1093-103.
30. Van Glabbeke MM, Owzar K, Rankin C, Simes J, Crowley J, and GIST Meta-analysis Group. Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors : a meta-analysis based on 1,640 patients. *Asco meeting abstracts* 2007 ; 25 : 10004.
31. Heinrich MC, McArthur GA, Demetri GD, Joensuu H, Bono P, Herrmann R, *et al.* Clinical and molecular studies of the effect of imatinib on advanced aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : 1195-203.
32. McArthur GA. Molecular targeting of dermatofibrosarcoma protuberans : a new approach to a surgical disease. *J Natl Compr Canc Netw* 2007 ; 5 : 557-62.
33. Sjoblom T, Shimizu A, O'Brien KP, Pietras K, Dal Cin P, Buchdunger E, *et al.* Growth inhibition of dermatofibrosarcoma protuberans tumors by the platelet-derived growth factor receptor antagonist STI571 through induction of apoptosis. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 5778-83.
34. McArthur GA, Demetri GD, van Oosterom A, Heinrich MC, Biac-Rychter M, Corless C, *et al.* Molecular and clinical analysis of locally advanced dermatofibrosarcoma protuberans treated with imatinib : Imatinib Target Exploration Consortium Study B2225. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 866-73.
35. Rubin BP, Schuetz SM, Eary JF, Norwood TH, Mirza S, Conrad EU, *et al.* Molecular targeting of platelet-derived growth factor B by imatinib mesylate in a patient with metastatic dermatofibrosarcoma protuberans. *J Clin Oncol* 2002 ; 20 : 3586-91.
36. Maki RG, Awan RA, Dixon RH, Jhanwar S, Antonescu CR. Differential sensitivity to imatinib of 2 patients with metastatic sarcoma arising from dermatofibrosarcoma protuberans. *Int J Cancer* 2002 ; 20(100) : 623-6.
37. Baars A, Pinedo HM. [Good response to treatment with the selective tyrosine-kinase inhibitor imatinib in a patient with metastatic dermatofibrosarcoma protuberans]. *Ned Tijdschr Geneesk* 2003 ; 147 : 2072-6.
38. Mizutani K, Tamada Y, Hara K, Tsuzuki T, Saeki H, Tamaki K, *et al.* Imatinib mesylate inhibits the growth of metastatic lung lesions in a patient with dermatofibrosarcoma protuberans. *Br J Dermatol* 2004 ; 151 : 235-7.
39. Labropoulos SV, Fletcher JA, Oliveira AM, Papadopoulos S, Razis ED. Sustained complete remission of metastatic dermatofibrosarcoma protuberans with imatinib mesylate. *Anticancer Drugs* 2005 ; 16 : 461-6.
40. Kasper B, Lossignol D, Gil T, Flamen P, De Saint-Aubain N, Awada A. Imatinib mesylate in a patient with metastatic disease originating from a dermatofibrosarcoma protuberans of the scalp. *Anticancer Drugs* 2006 ; 17 : 1223-5.
41. Mehrany K, Swanson NA, Heinrich MC, Weenig RH, Lee KK, White CR, *et al.* Dermatofibrosarcoma protuberans : a partial response to imatinib therapy. *Dermatol Surg* 2006 ; 32 : 456-9.
42. Nikolauou M, Valavanis C, Aravantinos G, Fountzilias G, Tamvakis N, Lekka I, *et al.* Kit expression in male germ cell tumors. *Anticancer Res* 2007 ; 27 : 1685-8.
43. Sakuma Y, Sakurai S, Oguni S, Hironaka M, Saito K. Alterations of the c-kit gene in testicular germ cell tumors. *Cancer Sci* 2003 ; 94 : 486-91.
44. Kemmer K, Corless CL, Fletcher JA, McGreevey L, Haley A, Griffith D, *et al.* KIT mutations are common in testicular seminomas. *Am J Pathol* 2004 ; 164 : 305-13.
45. Nakai Y, Nonomura N, Oka D, Shiba M, Arai Y, Nakayama M, *et al.* KIT (c-kit oncogene product) pathway is constitutively activated in human testicular germ cell tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 ; 337 : 289-96.
46. Biermann K, Goke F, Nettersheim D, Eckert D, Zhou H, Kahl P, *et al.* c-KIT is frequently mutated in bilateral germ cell tumours and down-regulated during progression from intratubular germ cell neoplasia to seminoma. *J Pathol* 2007 ; 213 : 311-8.
47. Willmore-Payne C, Holden JA, Chadwick BE, Layfield LJ. Detection of c-kit exons 11- and 17-activating mutations in testicular seminomas by high-resolution melting amplicon analysis. *Mod Pathol* 2006 ; 19 : 1164-9.
48. Izquierdo MA, Van der Valk V, Van Ark-Otte J, Rubio G, Germa-Lluch JR, Ueda R, *et al.* Differential expression of the c-kit proto-oncogene in germ cell tumours. *J Pathol* 1995 ; 177 : 253-8.
49. Basciani S, Brama M, Mariani S, De Luca G, Arizzi M, Vesci L, *et al.* Imatinib mesylate inhibits Leydig cell tumor growth : evidence for in vitro and in vivo activity. *Cancer Res* 2005 ; 65 : 1897-903.
50. Froehner M, Beuthien-Baumann B, Dittert DD, Schuler U, Wirth MP. Lack of efficacy of imatinib in a patient with metastatic Leydig cell tumor. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006 ; 58 : 716-8.
51. Einhorn LH, Brames MJ, Heinrich MC, Corless CL, Madani A. Phase II study of imatinib mesylate in chemotherapy refractory germ cell tumors expressing KIT. *Am J Clin Oncol* 2006 ; 29 : 12-3.
52. Eton O, Billings L, Kim K, Prieto V, Davis D, Frazier ML, *et al.* Phase II trial of imatinib mesylate (STI-571) in metastatic melanoma. *Asco meeting abstracts* 2004 ; 22 : 7528.
53. Ugurel S, Hildenbrand R, Zimpfer A, La, Rosee P, Paschka P, Sucker A, *et al.* Lack of clinical efficacy of imatinib in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 2005 ; 92 : 1398-405.
54. Wyman K, Atkins MB, Prieto V, Eton O, McDermott DF, Hubbard F, *et al.* Multicenter Phase II trial of high-dose imatinib mesylate in metastatic melanoma : significant toxicity with no clinical efficacy. *Cancer* 2006 ; 106 : 2005-11.
55. Fayette J, Dufresne A, Penel N, Le Cesne A, Bui Nguyen B, Tubiana-Hulin M, *et al.* Imatinib for the treatment of aggressive fibromatosis/desmoid tumors failing local treatment : updated outcome and predictive factors for progression free survival. A FNCLCC French Sarcoma Group-GETO study. *Asco meeting abstracts* 2007 ; 25 : 10062.
56. Shen SS, Zhang PS, Eton O, Prieto VG. Analysis of protein tyrosine kinase expression in melanocytic lesions by tissue array. *J Cutan Pathol* 2003 ; 30 : 539-47.

57. Leithner A, Gapp M, Radl R, Pascher A, Krippel P, Leithner K, et al. Immunohistochemical analysis of desmoid tumours. *J Clin Pathol* 2005 ; 58 : 1152-6.
58. Goncalves A, Monges G, Yang Y, Palmerini F, Dubreuil P, Noguchi T, et al. Response of a KIT-positive extra-abdominal fibromatosis to imatinib mesylate and KIT genetic analysis. *J Natl Cancer Inst* 2006 ; 98 : 562-3.
59. Seinfeld J, Kleinschmidt-Demasters BK, Tayal S, Lillehei KO. Desmoid-type fibromatoses involving the brachial plexus : treatment options and assessment of c-KIT mutational status. *J Neurosurg* 2006 ; 104 : 749-56.
60. Liegl B, Leithner A, Bauernhofer T, Windhager R, Guelly C, Regauer S, et al. Immunohistochemical and mutational analysis of PDGF and PDGFR in desmoid tumours : is there a role for tyrosine kinase inhibitors in c-kit-negative desmoid tumours? *Histopathology* 2006 ; 49 : 576-81.
61. Krystal GW, Hines SJ, Organ CP. Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor. *Cancer Res* 1996 ; 56 : 370-6.
62. Soria JC, Johnson BE, Chevalier TL. Imatinib in small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2003 ; 41(Suppl 1) : S49-S53 ; (S49-53).
63. Johnson BE, Fischer T, Fischer B, Dunlop D, Rischin D, Silberman S, et al. Phase II study of imatinib in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003 ; 9 : 5880-7.
64. Krug LM, Crapanzano JP, Azzoli CG, Miller VA, Rizvi N, Gomez J, et al. Imatinib mesylate lacks activity in small cell lung carcinoma expressing c-kit protein : a phase II clinical trial. *Cancer* 2005 ; 103 : 2128-31.
65. Dy GK, Miller AA, Mandrekar SJ, Aubry MC, Langdon RM, Morton RF, et al. A phase II trial of imatinib (ST1571) in patients with c-kit expressing relapsed small-cell lung cancer : a CALGB and NCCTG study. *Ann Oncol* 2005 ; 16 : 1811-6.
66. Desjardins A, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Sathornsumetee S, Friedman AH, Herndon J, et al. A Phase II study of imatinib mesylate and hydroxyurea for recurrent grade III malignant gliomas. *J Neurooncol* 2007 ; 83 : 53-60.
67. Reardon DA, Egorin MJ, Quinn JA, Rich JN, Gururangan S, Vredenburgh JJ, et al. Phase II study of imatinib mesylate plus hydroxyurea in adults with recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2005 ; 20(23) : 9359-68.
68. Dresemann G. Imatinib and hydroxyurea in pretreated progressive glioblastoma multiforme : a patient series. *Ann Oncol* 2005 ; 16 : 1702-8.
69. Schmandt RE, Broaddus R, Lu KH, Shvartsman H, Thornton A, Malpica A, et al. Expression of c-ABL, c-KIT, and platelet-derived growth factor receptor-beta in ovarian serous carcinoma and normal ovarian surface epithelium. *Cancer* 2003 ; 98 : 758-64.
70. Lassus H, Sihto H, Leminen A, Nordling S, Joensuu H, Nupponen NN, et al. Genetic alterations and protein expression of KIT and PDGFRA in serous ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2004 ; 91 : 2048-55.
71. Matei D, Chang DD, Jeng MH. Imatinib mesylate (Gleevec) inhibits ovarian cancer cell growth through a mechanism dependent on platelet-derived growth factor receptor alpha and Akt inactivation. *Clin Cancer Res* 2004 ; 10 : 681-90.
72. Apte SM, Fan D, Killion JJ, Fidler IJ. Targeting the platelet-derived growth factor receptor in antivasular therapy for human ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004 ; 10 : 897-908.
73. Coleman RL, Broaddus RR, Bodurka DC, Wolf JK, Burke TW, Kavanagh JJ, et al. Phase II trial of imatinib mesylate in patients with recurrent platinum- and taxane-resistant epithelial ovarian and primary peritoneal cancers. *Gynecol Oncol* 2006 ; 101 : 126-31.
74. Gross DJ, Munter G, Bitan M, Siegal T, Gabizon A, Weitzen R, et al. The role of imatinib mesylate (Glivec) for treatment of patients with malignant endocrine tumors positive for c-kit or PDGF-R. *Endocr Relat Cancer* 2006 ; 13 : 535-40.
75. Yao JC, Zhang JX, Rashid A, Yeung SC, Szklaruk J, Hess K, et al. Clinical and in vitro studies of imatinib in advanced carcinoid tumors. *Clin Cancer Res* 2007 ; 13 : 234-40.
76. Roy L, Guilhot J, Martineau G, Larchee R, Guilhot F. Unexpected occurrence of second malignancies in patients treated with interferon followed by imatinib mesylate for chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 2005 ; 19 : 1689-92.
77. Pilot PR, Sablinska K, Owen S, Hatfield A. Epidemiological analysis of second primary malignancies in more than 9500 patients treated with imatinib. *Leukemia* 2006 ; 20 : 148.



---

Les léiomyosarcomes sont des tumeurs malignes mésenchymateuses composées de cellules à différenciation musculaire lisse, constituant 15 % de tous les sarcomes de l'adulte. Elles présentent des altérations génétiques complexes avec pertes et gains de chromosomes variables selon les tumeurs, sans anomalies moléculaires récurrentes permettant de définir une entité nosologique contrairement aux autres sous-types de sarcomes associés à des translocations (sarcome d'Ewing), ou à des mutations spécifiques (GIST). Les événements moléculaires pilotant la tumeur restent inconnus et de ce fait aucune thérapie ciblée n'est encore identifiée. L'objectif de ce travail était d'identifier par protéomique de nouvelles cibles potentielles dans les léiomyosarcomes.

Dans ce travail, nous avons identifié des kinases activées dans les léiomyosarcomes en analysant le profil d'expression et de phosphorylation des kinases ainsi que des protéines de signalisation intracellulaire, sur une série de 13 tumeurs congelées de LMS. Parmi celles-ci, les protéines Tyro-3, PKC $\eta$ , et MSH2 ont été trouvées surexprimées dans toutes les tumeurs analysées comparé au tissu sain. Remarquablement, une perte de phosphorylation de FAK Y397 a été détectée dans toutes les tumeurs. D'autre part, une classification non supervisée hiérarchique a mis en évidence deux groupes de LMS, ayant des profils d'expression protéique distincts. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à Tyro-3 pour son rôle important dans la biologie cellulaire normale et maligne. Son ligand Gas6 a été trouvé exprimé dans 8 des 13 LMS, et sa co-expression avec Tyro-3 a été exclusivement associée à la phosphorylation d'Akt. Ces corrélations ont été retrouvées dans les deux lignées cellulaires de LMS SK-LMS-1 et CNIO AA. La déphosphorylation de FAK au résidu Y397 a été observée uniquement dans CNIO AA qui exprime fortement Gas6. L'addition de Gas6 exogène à SK-LMS-1 induit la phosphorylation d'Akt, et la déphosphorylation de FAK Y397. La double extinction de l'expression des gènes de Tyro-3 et Axl dans CNIO AA réduit la viabilité des cellules, suggérant un rôle crucial de cette voie dans la biologie des LMS.

---

### **Identification of novel activated signalling pathways in Leiomyosarcomas**

Soft tissue and visceral leiomyosarcoma (LMS) account for 15% of all sarcomas in adults. Molecular alterations in LMS are not well characterized, with often complex gains and losses of chromosome segments. We investigated the expression or phosphorylation of tyrosine kinases and downstream signalling molecules in a series of fresh frozen LMS and cell lines with the aim to identify potential targets for targeted therapy. Four proteins were found differentially expressed including Tyro3, a receptor tyrosine kinase. The functional activity of Tyro3 was investigated in 2 LMS cell lines, SK-LMS-1 and CNIO AA. Four proteins and phosphoproteins were found differentially expressed in LMS samples as compared to NSM: an hypophosphorylation of FAK Y397 was observed in all samples while Tyro3, MSH2, and PKC theta were found overexpressed in LMS samples. Gas6, the major ligand of Tyro3 was found expressed in 8 of the 13 samples, and the co expression of Gas6 and Tyro3 was found exclusively associated with Akt phosphorylation. Both SK-LMS-1 and CNIO AA LMS cell lines were found to express Tyro3, while Gas6 expression was only observed in CNIO AA cells. P-Akt was expressed spontaneously in CNIO AA, but not in SK-LMS-1, while the opposite figure was observed for phosphorylated FAK Y397. Exposure of SK-LMS-1 to exogenous Gas6 induced P-Akt, and resulted in a reduction of FAK Y397 phosphorylation. Transfection of CNIO AA with siRNA directed against, Tyro3 and Axl genes induced a reduction of the expression of the specific proteins, and when combined, significantly reduced CNIO AA cell viability. Gas 6 a ligand of Tyro3 is expressed in a subset of LMS tumors and cell lines, and may exert autocrine activities in a subset of leiomyosarcomas.

---

DISCIPLINE Cancérologie

MOTS-CLES **Léiomyosarcomas - kinases- Thérapie ciblée**

---

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

**INSERM U590-IFR 62- Equipe « Cytokines et Cancers »**

**Centre Léon Bérard- 28 rue Laënnec- 69373 LYON Cedex 08- FRANCE**