



**HAL**  
open science

# Ciblage de la voie PI3K/mTOR dans les léiomyosarcomes : sensibilité et mécanismes de résistance

Benjamin Fourneaux

## ► To cite this version:

Benjamin Fourneaux. Ciblage de la voie PI3K/mTOR dans les léiomyosarcomes : sensibilité et mécanismes de résistance. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0742 . tel-01885499

**HAL Id: tel-01885499**

**<https://theses.hal.science/tel-01885499>**

Submitted on 2 Oct 2018

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

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

Thèse présentée

Pour obtenir le grade de

**Docteur en Sciences de  
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé  
Spécialité Biologie Cellulaire, physiologie et pathologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Benjamin Fourneaux**

**Ciblage de la voie PI3K/mTOR dans les léiomyosarcomes :  
sensibilité et mécanismes de résistance**

Sous la direction du Pr. Antoine Italiano

Soutenue le 17 Novembre 2017 à 14h

Membres du jury :

Pr. Jean-Michel Coindre, Institut Bergonié

Président

Dr. Laurence Bianchini, Université de Nice

Rapporteur

Dr. Aurélie Dutour, Université de Lyon

Rapporteur

Dr. Christine Varon, Université de Bordeaux

Examineur

*« Il n'y a rien de noble à être supérieur à ses semblables. La vraie noblesse est d'être supérieur à celui que vous avez été auparavant »*

**Ernest Hemingway**

# REMERCIEMENTS

**A Monsieur Pierre Soubeyran,**

pour m'avoir accueilli dans l'unité U1218.

**A Monsieur Antoine Italiano,**

qui m'a fait confiance pour mener à bien ce projet de thèse. Merci pour ton enthousiasme communicatif et ta rigueur scientifique. Tu m'as appris ce qu'était la recherche préclinique et à rester motivé face aux résultats pouvant être parfois décourageants. Tu as été un véritable moteur qui m'a permis de réaliser cette thèse absolument sans encombre. Merci pour tout ! Les quatre années passées dans ton équipe marqueront à jamais ma vie professionnelle.

**A Monsieur Jean-Michel Coindre,**

de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider mon jury. Merci de votre disponibilité et de vos connaissances sur les sarcomes.

**A Madame Laurence Bianchini et Madame Aurélie Dutour,**

d'avoir accepté d'être rapporteur de mon jury de thèse et de consacrer du temps à la lecture de mon travail.

**A Madame Christine Varon,**

d'avoir accepté d'être examinateur à mon jury de thèse. Merci de m'avoir fait part de vos connaissances et vos conseils sur le vaste sujet que sont les cellules souches.

**A Audrey,**

pour ton rôle dans la réussite de cette thèse. Merci pour ta disponibilité, tes conseils et ton encadrement au sein du laboratoire. Tu as été une seconde chef pour moi et je t'en remercie énormément. Garde ton caractère flamboyant qui donne de l'âme à cette unité.

**A Vanessa,**

ma binôme durant ces quatre années. Tu as vécu avec moi les hauts et les bas de la vie d'un thésard. Merci pour ton soutien et surtout ton expertise dans les « manips ». Tu as été une véritable formatrice pour moi. Merci également d'avoir suivi avec tant d'enthousiasme les nombreuses compétitions sportives.

**A Valérie et François,**

à qui je suis infiniment redevable pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée tout au long de ces années à chaque fois que je les ai sollicités.

**A Kelly et Paul,**

pour tous ces supers moments qu'on a vécu. Merci pour les gâteaux à la Guinness, merci pour ces approximations horaires qui nous ont fait manger régulièrement à 14h et merci surtout pour ces nombreuses heures passées au St-Aubin.

**A tous mes camarades de travail,**

Julie, je n'ai pas de mots... Un rayon de soleil ! Merci pour ces nombreux fous rires qu'on a pu avoir le midi et pour avoir dévoré en un temps record les rares bonbons que je ramenaient au labo.

Stéphanie, dernière arrivée dans l'équipe sarcome. Merci pour ta bonne humeur. Je ne savais pas qu'on pouvait être si mauvais au Mōlky.

Coach Éric, Xavier, Manu, Nicolas, Guillaume, mes compères de la section Tennis de Bergonié. Merci pour cette finale du tournoi entreprise jouée (et perdue !). Les apéros pain, pâté, vin, d'après-match vont me manquer.

Mojgan, pour m'avoir accepté en stage de Master 2 et m'avoir appris les rudiments de la culture cellulaire. C'est un peu grâce à toi si j'en suis là aujourd'hui.

Candichou, Jennifer, Lulu, Tom, Vanessa, Olivier, Thomas, Christophe, Nicolas, Anne-Marie, Stéphane, Laurence, Karim, Elodie, Valérie et à ceux que j'aurais pu oublier de citer, pour tous les bons moments passés ensemble.

**A Simon,**

pour ton amitié. Je suis fier de t'avoir fait apprécier le café, crois-moi cela a été salvateur pour nous deux ! Je n'oublierais pas les nombreuses activités sportives (sessions d'escalades, randonnées dans les Pyrénées, pêche en lac d'altitude, courses d'obstacles, tennis, canoë, surf) et la réhydratation qui s'en suivait qui m'ont permis de penser à autre chose qu'au travail. Merci pour tout.

**A mes amis,**

Ade, Briçou alias « black fish », July, Malo le breton, Emma alias « l'œil de Moscou », Patou, Dud, Saucisse, Fab, Hélène, Cédric alias « le druide », Caca, Mika, Clem, Aimery « Debisca », Chacha, Lolo. Grâce à vous, je connais de nombreux bars bordelais, je sais jouer au palais breton, je peux ouvrir un magasin de console rétro, parler le portugais, danser la salsa, chanter du Kyo à tue-tête, boire de la potion magique sans grimacer, tricher avec brio à la belote, j'en passe et des meilleurs. Merci à vous tous d'avoir été présent durant ces quatre années.

**A ma famille,**

Mes grands-parents, mes beaux-parents, Jess, Stéph et Mélina, merci de m'avoir soutenu.

**A mes parents,**

D'avoir toujours cru en moi malgré quelques désillusions. Merci de m'avoir donné les moyens de réussir. Je vous en suis tellement reconnaissant.

**A Jérémy, mon frère,**

Merci pour m'avoir aidé à décompresser tout au long de cette thèse grâce aux nombreuses heures de console.

**A Sandrine, ma p'tite femme,**

qui a été formidable, d'un grand soutien et patiente avec moi ces quatre dernières années. Merci pour tes nombreuses relectures, pour tes conseils avisés, pour ton franc-parler et aussi

pour le choix des couleurs de mes posters et graphiques. Merci de t'être intéressée à mon travail même si tu ne comprenais pas toujours... Avec cette thèse de 160 pages, j'espère que tu as enfin compris ! Merci aussi de m'avoir soutenu pour boire une petite mousse après une journée difficile (dieu sait qu'elles ont été nombreuses !). Je te suis redevable d'avoir été présente pour moi jusqu'au bout. Cette thèse est aussi un peu la tienne. A notre complicité et à nos belles années à venir.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>9</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>13</b>
<b>PRÉAMBULE .....</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>15</b>
<b>Chapitre 1 - Les Tumeurs des tissus mous .....</b>	<b>16</b>
A. Définition.....	16
B. Epidémiologie.....	17
B.1 Prévalence, incidence et mortalité .....	17
B.2 Etiologie.....	18
B.2.1 Les prédispositions génétiques .....	18
B.2.2 La radiothérapie .....	18
B.2.3 Les infections virales .....	18
B.2.4 L'environnement.....	18
C. Classification actuelle des sarcomes des tissus mous.....	19
C.1 Classification histologique.....	19
C.1.1 Les sarcomes à translocations spécifiques .....	20
C.1.2 Les sarcomes à amplifications simples .....	21
C.1.3 Les sarcomes à mutations activatrices ou inhibitrices .....	21
C.1.4 Les sarcomes à génomiques complexes.....	22
C.2 Classification selon le grade histologique .....	22
C.3 Classification selon le stade.....	23
D. Prise en charge thérapeutique .....	24
D.1 Sarcomes des tissus mous localisés .....	24
D.2 Sarcomes des tissus mous métastatiques .....	24



---

<b>Chapitre 2 – Les léiomyosarcomes .....</b>	<b>26</b>
A. Généralités .....	26
B. Epidémiologie.....	26
C. Localisation des léiomyosarcomes .....	27
C.1 Les LMS rétropéritonéaux .....	27
C.2 Les LMS cutanés superficiels .....	27
C.3 Les LMS des membres .....	28
C.4 Les LMS d'origine vasculaire .....	28
D. Les altérations génomiques connues .....	28
D.1 Les altérations cytogénétiques.....	28
D.2 Les altérations moléculaires .....	30
D.2.1 La voie TP53.....	31
D.2.2 ATRX .....	31
D.2.3 RB1 .....	31
D.2.4 MYOCARDIN.....	31
D.2.5 La voie PI3K/mTOR.....	32
E. Traitements des LMS.....	32
<b>Chapitre 3 - La voie de signalisation PI3K/mTOR dans les tumeurs humaines .....</b>	<b>34</b>
A. Généralités .....	34
B. Les composantes de la voie PI3K/mTOR.....	35
B.1 La PI3K de classe I.....	35
B.1.1 Structure et fonctions .....	35
B.1.2 Activation et régulation de la PI3K de classe I.....	36
B.1.3 PTEN.....	37
B.1.4 SHIP1 et SHIP2 .....	40
B.2 La protéine kinase AKT.....	40
B.2.1 Structure et fonctions .....	40
B.2.2 Activation et régulation de la protéine AKT.....	41
B.2.3 Les phosphatases INPP4B, PP2A et PHLPP .....	43
B.2.4 Les fonctions physiologiques d'AKT .....	43
B.3 La protéine mTOR.....	45
B.3.1 Le complexe mTORC1 : structure et régulations .....	45
B.3.2 Le complexe mTORC2 : structure et régulations .....	48

---

C. Les régulations de la voie de signalisation PI3K/mTOR .....	50
C.1 Les boucles de rétrocontrôle .....	50
C.2 La voie de signalisation RAS/MAPK.....	51
C.2.1 Les kinases effectrices de la voie RAS/MAPK .....	52
C.2.2 Les interconnexions avec la voie PI3K/mTOR .....	53
<b>Chapitre 4 - La voie PI3K/mTOR comme cible thérapeutique.....</b>	<b>55</b>
A. Les inhibiteurs de première génération .....	55
A.1 Les inhibiteurs de PI3K.....	55
A.2 Les inhibiteurs de mTOR .....	55
B. Les inhibiteurs de seconde génération.....	58
B.1 Les inhibiteurs de PI3K .....	58
B.2 Les inhibiteurs d'AKT.....	59
B.3 Les inhibiteurs à double cible .....	61
C. La résistance aux inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR .....	63
C.1 Les boucles de rétrocontrôle et les altérations génomiques.....	64
C.2 Les pompes d'efflux .....	64
C.3 L'approche métabolique .....	65
C.4 La voie autophagique.....	66
C.5 Les cellules souches cancéreuses.....	67
<b>Conclusions.....</b>	<b>69</b>
<b>RESULTATS EXPERIMENTAUX .....</b>	<b>70</b>
<b>Partie 1 - Sensibilité aux inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR.....</b>	<b>71</b>
A. Résumé de l'article .....	72
B. Article : “Dual inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway suppresses the growth of leiomyosarcomas but leads to ERK activation through mTORC2: Biological and clinical implications.” .....	74
<b>Partie 2 - Résistance secondaire au ciblage de la voie PI3K/mTOR.....</b>	<b>88</b>
A. Résumé de l'article .....	89

B. Article : “Secondary resistance to PI3K/mTOR inhibition is linked to cancer stem cells and is circumvented by EZH2 inhibition.” .....	91
<b>DISCUSSION GENERALE &amp; PERSPECTIVES .....</b>	<b>126</b>
<b>PUBLICATIONS ANNEXES .....</b>	<b>133</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>145</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

### 4

4E-BP1 : 4E-Binding Protein 1

### A

ABD : Adaptator Binding Domain  
 ADN : Acide Désoxyribonucléique  
 AJCC : American Joint Cancer Committee  
 ALDH : Aldehyde Dehydrogenase  
 ALT : Alternative Lengthening of  
 Telomeres  
 AMP : Adénosine Monophosphate  
 AMPK : AMP Activated Protein Kinase  
 ARN : Acide Ribonucléique  
 ATG : Autophagy-related Gene  
 ATP : Adénosine Triphosphate  
 ATRA : All-Trans Retinoic Acid  
 ATRX : Alpha Thalassemia/Mental  
 Retardation Syndrome X-Linked

### B

BAD : Bcl-Associated Death  
 Bcl-2 : B-cell lymphoma-2  
 BCRP1 : Breast Cancer Resistance Protein  
 1  
 BECLIN1 Coiled-Coil Myosin-Like Bcl2-  
 Interacting Protein 1  
 BH : Bcl-2 Homology  
 BIM : Bcl-2 Interacting Mediator of cell  
 death

### C

CDK : Cyclin Dependent Kinase  
 CENP-C : Centromere Protein C  
 CGH : Comparative Genomic  
 Hybridization  
 CHEK2 : Checkpoint Kinase 2  
 CSC : Cellule Souche Cancéreuse

### D

DEPTOR : DEP domain containing mTOR  
 interacting protein  
 DNA-PK : DNA-dependent Protein Kinase  
 DUSP : Dual Specificity Phosphatase

### E

EEF2 : Eukaryotic translation Elongation  
 Factor 2  
 EGF : Epidermal Growth Factor  
 EIF4E : Eukaryotic translation Initiation  
 Factor 4E  
 EIF4EBP1 : EIF4E Binding Protein 1  
 EMA : European Medicines Agency  
 ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated  
 Kinases 1/2  
 EZH2 : Enhancer of Zeste Homolog 2

### F

FAK : Focal Adhesion Kinase  
 FAT : Focal Adhesion Targeting  
 FBW8 : FBox and WD repeat domain  
 containing 8  
 FDA : Food and Drug Administration  
 FISH : Fluorescence In Situ Hybridization  
 FKBP12 : FK506 Binding Protein 12  
 FNCLCC : Fédération Nationale des  
 Centres de Lutttes Contre le Cancer  
 FOS : Finkel-Biskis-Jinkins Osteosarcoma  
 FOXO : Forkhead Box O3  
 FRB : FKBP12-Rapamycin Binding  
 domain

### G

GAB1 : GRB2-Associated-Binding protein  
 1  
 GAP : GTPase Activating Protein  
 GDP : Guanosine Diphosphate

GEF : G-protein Exchange protein  
 GIST : Gastro Intestinal Stromal Tumor  
 GRB : Growth factor Receptor-Bound  
 GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3  
 GTP : Guanosine Triphosphate

## *H*

HHV8 : Herpès-Virus Humain type 8  
 HIF-1 : Hypoxia Inductible Factor 1

## *I*

ICGC : International Cancer Genome Consortium  
 ID1 : DNA-binding 1  
 IEG : Immediate Early Gene  
 IGF : Insulin Growth Factor  
 IGF1R : Insulin Growth Factor 1 Receptor  
 INPP4B : Inositol Polyphosphate-4-Phosphatase  
 IRS1/2 : Insulin Receptor Substrate 1 and 2

## *K*

kDa : Kilodalton  
 KO : Knock-out

## *L*

LAT : Linker for Activation of T-cells  
 LC3 : Light Chain 3  
 LMS : Léiomyosarcome

## *M*

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase  
 MCL1 : Myeloid Cell Leukemia 1  
 MDM2 : Mouse Double Minute 2 homolog  
 MDR : Résistance Multidroge  
 MDR1 : Multidrug Resistance protein 1  
 MEK1/2 : Mitogen-activated Extracellular-signal-regulated Kinases 1/2  
 miARN : micro-ARN  
 MKRN1 : Makorin Ring actor protein 1  
 mLST8 : mammalian Lethal with Sec13 protein 8  
 mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

mTORC1/2 : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1/2  
 MYOCD : MYOCARDIN

## *N*

NF1 : Neurofibromatosis 1  
 NF-κB : Nuclear Factor-kappa B  
 NOTCH : Notch Homolog 1

## *O*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

## *P*

p70S6K : Ribosomal protein S6 Kinase beta-1  
 p90RSK : p90 Ribosomal S6 Kinase  
 PCAF : P300/CBP-Associated Factor  
 PDGF : Platelet-Derived Growth Factor  
 PDGFRA : Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha  
 PDK1 : 3-Phosphoinositide-Dependent Kinase 1  
 PH : Plekstrin Homology  
 PHLPP : PH domain Leucine-rich repeat Protein Phosphatase  
 PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase  
 PI3KCA : Phosphoinositide 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha  
 PI3KCB : Phosphoinositide 3-Kinase Catalytic Subunit Beta  
 PIP<sub>2</sub> : Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate  
 PIP<sub>3</sub> : Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate  
 PKA : Protein Kinase A  
 PKB : Protein Kinase B (AKT)  
 PKC : Protein Kinase C  
 PP2A : Protein Phosphatase 2A  
 PRAS40 : Proline-Rich AKT substrate of 40 kDa  
 PRC2 : Polycomb Repressive Complex 2  
 PROTOR1/2 : Protein Observed with Rictor-1/2  
 PTEN : Phosphatase and Tensin homolog

PUMA : P53 Up-regulated Modulator of Apoptosis

## Q

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

## R

RAPTOR : Regulatory Protein Associated with mTOR

RB1 : Retinoblastoma 1

RBD : RAS-Binding Domain

RCPG : Récepteur Couplé à des Protéines G

RHEB : RAS Homolog Enriched in Brain

RICTOR : Rapamycin Insensitive Companion of mTOR

ROCK : RHOA-associated protein Kinase

ROS : Reactive Oxygen Species

RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

## S

S6K1 : S6 Kinase 1

S6RP : S6 Ribosomal Protein

SALL4 : Sal-Like protein 4

Ser : Sérine

SGK1 : Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1

SH2 : Src Homology 2

SH3 : Src Homology 3

SHIP : SH2 domain-containing Inositol 5'-Phosphatase

SIN1 : Stress-activated protein kinase-Interacting 1

SMARCB1 : SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependent Regulator of Chromatin, subfamily B, member 1

SOS : Son Of Sevenless homolog

SOX2 : Sex determining region Y-box 2

SREBP : Sterol Regulatory Element Binding Protein

STM : Sarcomes des Tissus Mous

## T

TCF : Ternary Complex Factor

Thr : Thréonine

TNM : Tumor-Node-Metastatic spread

TOS : TOR signaling Sequence

TSC1 : Tuberous Sclerosis 1

TSC2 : Tuberous Sclerosis 2

## U

UICC : Union Internationale Contre le Cancer

## V

VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

VHL : Von Hippel-Lindau

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

**TABLE DES ILLUSTRATIONS**

Figure 1 : Localisation des tumeurs de tissus mous .....	16
Figure 2 : Survie relative à 5 ans (en %) suivant l'histologie de la tumeur des tissus mous ...	17
Figure 3 : Répartition des sous-types histologiques des sarcomes.....	19
Figure 4 : Courbe de survie suivant le grade histologique, la taille et la profondeur de la tumeur.....	23
Figure 5 : Schéma général de la prise en charge des tumeurs des tissus mous .....	25
Figure 6 : Photos représentatives de léiomyosarcomes (x40) : coloration à l'hématoxyline éosine safran (a), expression de la caldesmone (b) et de la transgeline (c).....	26
Figure 7 : Caryotype représentatif d'un individu sain (gauche) et atteint d'un LMS (droite) .	29
Figure 8 : La voie de signalisation PI3K/mTOR et ses fonctions cellulaires .....	34
Figure 9 : Représentation schématique des sous-unités de la PI3K de classe I .....	35
Figure 10 : Modèle d'activation de la PI3K.....	37
Figure 11 : Les mécanismes de régulation de la phosphatase PTEN.....	39
Figure 12 : Représentation de la structure d'AKT .....	41
Figure 13 : Schéma du cycle d'activation de la kinase AKT .....	42
Figure 14 : Substrats et fonctions de la signalisation de la kinase AKT .....	45
Figure 15 : Structure du complexe mTORC1 .....	46
Figure 16 : Régulations et fonctions du complexe mTORC1 .....	48
Figure 17 : Structure du complexe mTORC2 .....	49
Figure 18 : Les boucles de rétrocontrôle de la voie PI3K/mTOR.....	51
Figure 19 : Les boucles de rétrocontrôle négatif de la voie RAS/MAPK.....	53
Figure 20 : La voie RAS/MAPK et ses interactions avec la voie PI3K/mTOR.....	54
Figure 21 : Les étapes de l'autophagie et sa régulation .....	67
Figure 22 : Schéma des concepts de l'origine du cancer .....	68

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Translocations spécifiques dans les sarcomes.....	21
Tableau 2 : Stade TNM selon l'AJCC/UICC (2010).....	24
Tableau 3 : Les aberrations génétiques fréquentes dans les LMS.....	30
Tableau 4 : Les altérations moléculaires fréquentes observées dans les LMS.....	32
Tableau 5 : Les inhibiteurs de première génération de mTOR en essai clinique.....	57
Tableau 6 : Les inhibiteurs de PI3K en essai clinique .....	59
Tableau 7 : Les inhibiteurs d'AKT en essai clinique.....	60
Tableau 8 : Les inhibiteurs doubles cibles en essai clinique.....	62



## PRÉAMBULE

Les sarcomes représentent un groupe hétérogène de cancers rares avec une incidence estimée à 4 500 nouveaux cas par an en France. Malgré un traitement locorégional bien conduit (chirurgie associée à de la radiothérapie), plus de 40 % des patients atteints de sarcomes vont développer une rechute métastatique. Les agents cytotoxiques classiques (doxorubicine, ifosfamide, gemcitabine) ont dans cette situation une efficacité limitée. En effet, la survie médiane des patients n'est que de 12 à 18 mois. Les progrès réalisés dans la connaissance de la biologie des tumeurs ont conduit à identifier de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons cherché à caractériser le potentiel thérapeutique du ciblage de la voie PI3K/mTOR dans un sous-type particulier de sarcome, le léiomyosarcome. Nous avons étudié les antitumoraux de plusieurs inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR sur différentes lignées cellulaires humaines de léiomyosarcome. Nous avons également développé des modèles de résistance secondaire à ces inhibiteurs afin de déterminer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

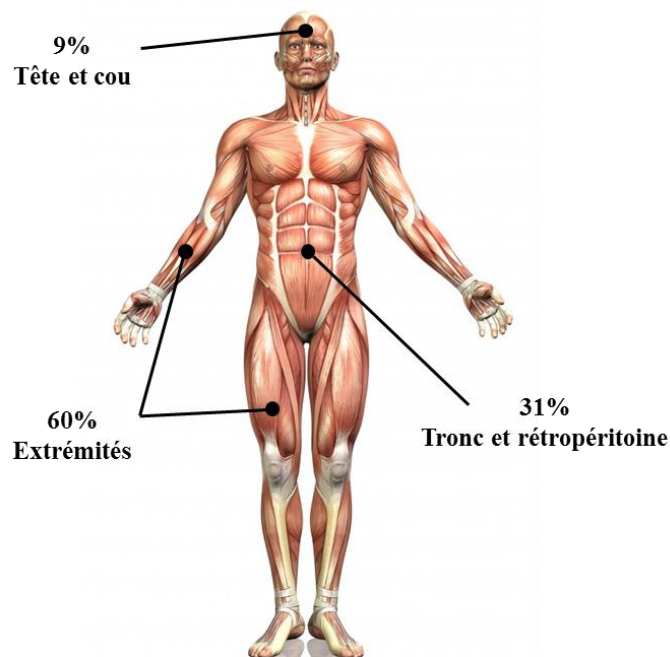
Nous aborderons dans un premier temps les caractéristiques cliniques et morphologiques des sarcomes des tissus mous en général et des léiomyosarcomes en particulier. Nous ferons ensuite une description de la voie de signalisation PI3K/mTOR, de son rôle dans la tumorigenèse et de son potentiel en termes de cible thérapeutique. La deuxième partie du manuscrit sera consacrée à la présentation et à la discussion de nos résultats expérimentaux ainsi qu'aux perspectives qu'ils impliquent.

# **INTRODUCTION**

## Chapitre 1 - Les Tumeurs des tissus mous

### A. Définition

Les tissus mous ont pour origine embryologique principale le mésoderme et sont des éléments du corps qui servent de soutien aux organes. Ce sont des tissus, non osseux et non composés d'épithélium, qui regroupent notamment les tissus adipeux, les tissus synoviaux (tissus qui entourent les articulations), les muscles (lisses et striés), les vaisseaux sanguins et lymphatiques, les tendons et les nerfs (Dennis et al., 2012). Les tissus mous peuvent être le siège de tumeurs bénignes ou malignes. Dans ce dernier cas, on parle de « sarcome » (du grec ancien *sarks, sarkos*, la chair). Les sarcomes des tissus mous (STM) peuvent survenir dans n'importe quelle localisation anatomique. Les extrémités en particulier inférieures représentent la localisation la plus fréquente (Grimer et al., 2010).



(Honoré et al., 2015)

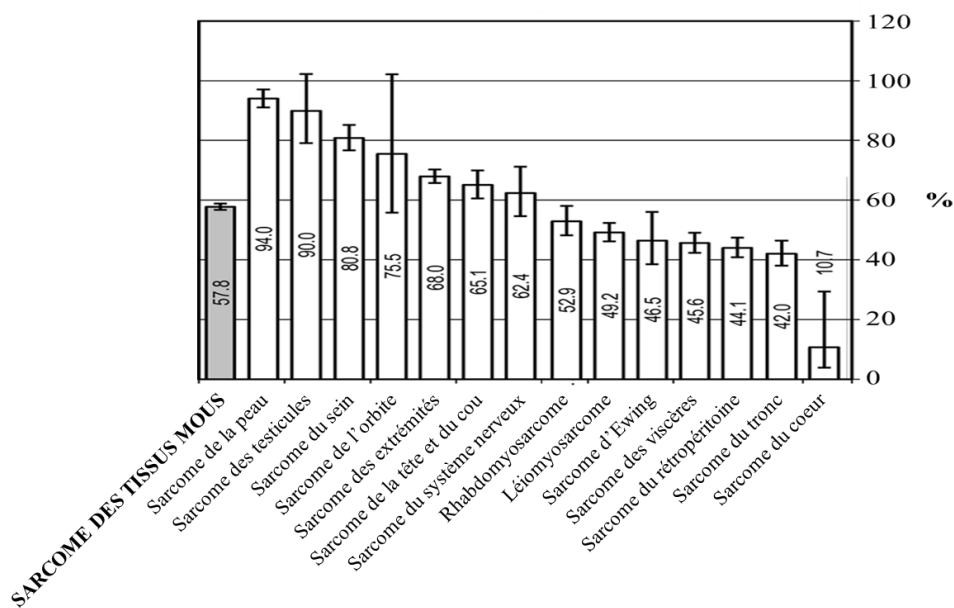
*Figure 1 : Localisation des tumeurs de tissus mous*

## B. Epidémiologie

### B.1 Prévalence, incidence et mortalité

La prévalence moyenne des sarcomes se situerait à environ 4,6 pour 10 000 dans l'ensemble de la population mondiale, soit 100 fois moins que celle des tumeurs bénignes (Wibmer et al., 2010). L'incidence des STM, normalisée selon l'âge, est d'environ 5 pour 100 000 habitants avec 25 000 nouveaux cas par an en Europe et elle est globalement identique entre les hommes et les femmes (Boam et al., 2016). L'âge médian de survenue est 55 ans. Les sarcomes représentent seulement 1 % des tumeurs malignes de l'adulte mais jusqu'à 8 % chez l'enfant et l'adolescent (Torre et al., 2015). L'incidence en France serait ainsi de l'ordre de 4 000 nouveaux cas par an (Ducimetière et al., 2011).

La survie relative à 5 ans des patients atteints de sarcomes est médiocre en comparaison de celle d'autres cancers atteignant environ 58 % (Stiller et al., 2013). L'âge du patient, le type histologique et le grade de la tumeur sont trois facteurs pronostics majeurs de la survie globale des patients (Coindre et al., 1996). Les taux de survie sont généralement similaires entre les hommes et les femmes (Ferrari et al., 2016).



(Stiller et al., 2013)

*Figure 2 : Survie relative à 5 ans (en %) suivant l'histologie de la tumeur des tissus mous*

## **B.2 Etiologie**

Les facteurs de risques des sarcomes des tissus mous sont mal connus. Certains d'entre eux ont pu toutefois être identifiés.

### B.2.1 Les prédispositions génétiques

Certaines affections génétiques héréditaires ont été associées à un risque de survenue d'un sarcome des tissus mous. Parmi elles, le rétinoblastome héréditaire causé par une mutation du gène *RBI*, le syndrome de Werner, trouble très rare causé par une mutation du gène *WRN*, le syndrome de Li-Fraumeni causé par une mutation du gène *TP53* ou du gène *CHEK2* et la neurofibromatose de type 1 (maladie de Recklinghausen) causée par une mutation du gène *NF1* (Ballinger et al., 2016; Kleinerman et al., 2012; Pemov et al., 2017).

### B.2.2 La radiothérapie

L'exposition à des rayonnements ionisants a été associée à un risque accru de survenue de sarcomes parfois plusieurs années après l'exposition. Par exemple, l'incidence d'apparition d'une tumeur des tissus mous après radiothérapie est d'environ 1 % (Galper et al., 2002). La plupart des estimations sont basées sur des patientes atteintes d'un cancer du sein et traitées par irradiation adjuvante. Par ailleurs, une récente étude suggère que des patients ayant une mutation germinale du gène *RBI* ont un risque plus élevé de développer des sarcomes après irradiation (Rosemann et al., 2014).

### B.2.3 Les infections virales

Plusieurs virus ont été décrits comme étant des facteurs favorisant la survenue de tumeurs des tissus mous. Par exemple, le virus Epstein-Barr est associé au développement de tumeurs des muscles lisses (Lee et al., 1995) tandis que le virus humain de l'herpès 8 (HHV8) joue un rôle clé dans la survenue du sarcome de Kaposi (Chang et al., 1994).

### B.2.4 L'environnement

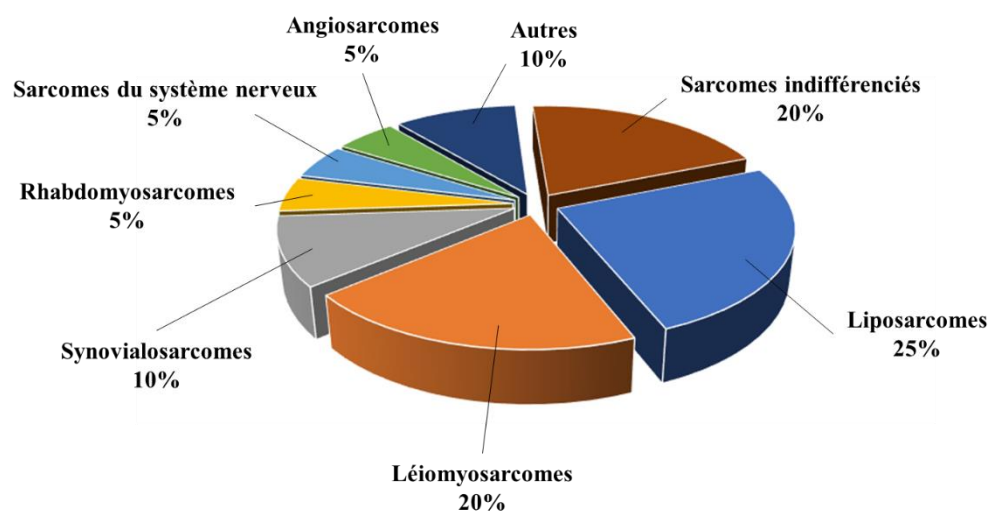
De nombreux herbicides produit dans les années 1940 (composés notamment de chlorure de vinyle, de dioxine ou encore d'acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique) et largement

utilisés dans l'agriculture, la foresterie, les parcs et les jardins ont été corrélés à l'apparition de tumeurs des tissus mous (Coggon et al., 2015).

## C. Classification actuelle des sarcomes des tissus mous

### C.1 Classification histologique

La classification histologique de référence des tumeurs des tissus mous est celle publiée sous l'égide de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). L'OMS répertorie les tumeurs bénignes et malignes des tissus mous en 12 grandes classes secondairement divisées en 113 sous-types histologiques (Fletcher, 2014). Cette classification repose sur la mise en évidence d'une ligne de différenciation phénotypique révélée par l'étude histologique et immunohistochimique. Ainsi, les tumeurs des tissus mous présentant une ligne de différenciation musculaire lisse sont appelées « léiomyomes » lorsqu'elles sont bénignes et « léiomyosarcomes » lorsqu'elles présentent des caractéristiques histologiques de malignité. Les liposarcomes (tissus graisseux), les léiomyosarcomes et les sarcomes indifférenciés (sarcomes qui ne montrent pas de ligne de différenciation identifiable) sont les histotypes les plus fréquents de sarcomes.



(Neuville et al., 2013)

*Figure 3 : Répartition des sous-types histologiques des sarcomes*

Toutefois cette classification histologique présente des limites. En effet la morphologie ou le stade de différenciation de certaines tumeurs peuvent conduire à des erreurs de classification nosologique et donc de diagnostic. Par exemple, les synovialosarcomes sont

classés parmi les tumeurs malignes à différenciation incertaine selon l’OMS car ils n’appartiennent pas à une lignée de différenciation clairement définie et leur histogenèse est inconnue. Les liposarcomes dédifférenciés posent également problème et peuvent être confondu avec d’autres types de sarcomes non adipeux. Pour repousser ces limites de classifications morphologiques apparentes, des études cytogénétiques permettent, en complément, de faire le tri des tumeurs des tissus mous en déterminant des marqueurs d’identifications et permettre une classification objective et reproductible. On peut actuellement classer les sarcomes en 2 grandes catégories moléculaires :

- Les sarcomes à génomique simple caractérisés par des anomalies telles que des translocations chromosomiques récurrentes, des amplifications simples ou encore des mutations.
- Les sarcomes à génomique complexe.

### C.1.1 Les sarcomes à translocations spécifiques

Environ 30 % des sarcomes sont caractérisés par une translocation réciproque spécifique. La description en 1983 d’une translocation récurrente dans le sarcome d’Ewing a été la première anomalie moléculaire spécifique décrite dans une tumeur solide humaine. Cette translocation constitue actuellement le critère majeur de définition du sarcome d’Ewing (Aurias et al., 1983). Le développement des techniques de biologie moléculaire associé à la cytogénétique permettent actuellement de détecter de nombreuses autres translocations comme par exemple la translocation  $t(12;16)(q13;p11)$  qui caractérise le liposarcome myxoïde à cellules rondes (Panagopoulos et al., 1997). Parmi une dizaines d’histotypes différents, les rhabdomyosarcomes alvéolaires ou encore les synoviosarcomes rentrent également dans cette catégorie (Jain et al., 2010).

Histologie	Translocations	Gènes de fusion	Fréquences
Sarcome d'Ewing	t(11;22)(q24;q12)	EWSR1-FLI1	90 %
	t(21;22)(q22;q12)	EWSR1-ERG	8 %
	t(7;22)(p22;q12)	EWSR1-ETV1	rare
	t(17;22)(q12;q12)	EWSR1-ETV4	rare
	t(2;22)(q33;q12)	EWSR1-FEV	rare
	t(16;21)(p11;q22)	FUS-ERG	rare
Synoviosarcome	t(X;18)(p11;q11)	SS18-SSX1	65 %
	t(X;18)(p11;q11)	SS18-SSX2	35 %
	t(X;18)(p11;q13)	SS18-SSX4	rare
Liposarcome myxoïde / à cellules rondes	t(12;16)(q13;p11)	FUS-DDIT3	95 %
	t(12;22)(q13;q12)	EWSR1-DDIT3	rare
Rhabdomyosarcome alvéolaire	t(2;13)(q35;q14)	PAX3-FOXO1A	70 %
	t(1;13)(q36;q14)	PAX7-FOXO1A	20 %
	t(2;X)(p35;q13)	PAX3-MLLT7	rare
	t(2;2)(q35;q23)	PAX3-NCOAI	rare
Tumeur desmoplastique à cellules rondes	t(11;22)(p13;q12)	EWSR1-WT1	95 %
	t(21;22)(q22;q12)	EWSR1-ERG	rare
Fibrosarcome congénital	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3	90 %
Chondrosarcome myxoïde extra-squelettique	t(9;22)(q22;q12)	EWSR1-NR4A3	75 %
	t(9;17)(q22;q11)	TAF2N-NR4A3	25 %
	t(9;15)(p22;q21)	TFC12-NR4A3	rare
	t(9;22)(q22;q15)	TFG-NR4A3	rare
Dermatofibrosarcome	t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB	95 %
Sarcome à cellule claire	t(12;22)(q13;q12)	EWSR1-ATF1	95 %
	t(2;22)(q33;q12)	EWSR1-CREB1	rare

*Tableau 1 : Translocations spécifiques dans les sarcomes*

### C.1.2 Les sarcomes à amplifications simples

Ce groupe est représenté principalement par les liposarcomes bien différenciés et les liposarcomes dédifférenciés qui sont caractérisés par une amplification récurrente des gènes *MDM2* (100 % des cas) et *CDK4* (90% des cas) (Sirvent et al., 2007). Le diagnostic des tumeurs des tissus adipeux est alors facilité par une analyse immunohistochimique complétée si nécessaire par des techniques comme la « *Polymerase Chain Reaction* » quantitative (qPCR) ou l'hybridation in situ en fluorescence (FISH).

### C.1.3 Les sarcomes à mutations activatrices ou inhibitrices

Les tumeurs stromales gastro intestinales (GIST) sont des tumeurs développées aux dépens du tractus digestif et présentent dans 80-85 % des cas, une mutation activatrice au niveau de l'exon 11 (65 % des patients), l'exon 9 (10 % des patients), l'exon 13 ou l'exon 17 du gène



*KIT* (Reichardt et al., 2016). Dans 10-15 % des cas, les patients ne présentent pas de mutation du gène *KIT* mais une mutation du gène *PDGFRA* dans l'exon 12, 14 ou 18. Ces mutations constituent une cible thérapeutique qui a bouleversé le pronostic de ces patients. La survie à 1 an des patients atteint de GIST est voisine de 90 % avec l'utilisation de l'imatinib (Gleevec®), un inhibiteur des tyrosines kinases (George et al., 2012).

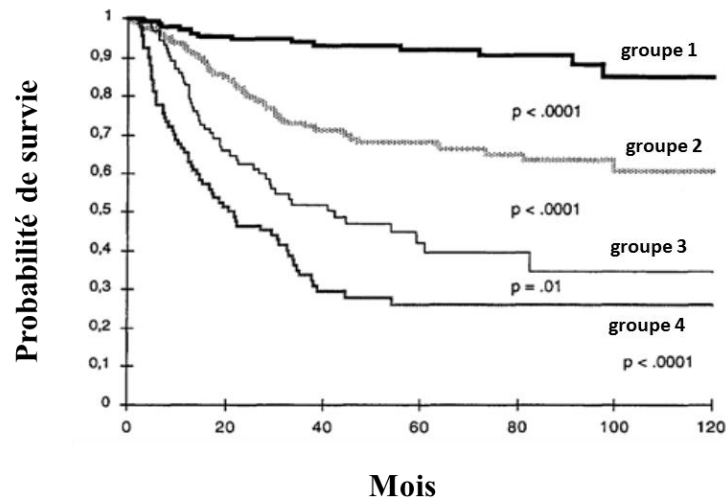
Des mutations inactivatrices sont observées au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs comme *NF1* dans les tumeurs malignes des gaines des nerfs périphériques (Friedrich et al., 2007). Egalement, des tumeurs rares comme la tumeur rhabdoïde, touchant principalement les enfants, et le sarcome épithélioïde présentent une inactivation du gène *SMARCB1*, impliqué dans le remodelage de la chromatine (Biegel et al., 1999).

#### C.1.4 Les sarcomes à génomiques complexes

Plus de 50 % des sarcomes des tissus mous de l'adulte ne comportent pas d'anomalie génomique spécifique ni récurrente et sont dits à génomique complexe. Ils surviennent en général à un âge plus tardif que les sarcomes à génétique simple et ils sont caractérisés par une histologie plus agressive et une altération fréquente de la voie TP53 (Pérot et al., 2010). Les léiomyosarcomes, les liposarcomes pléomorphes, les rhabdomyosarcomes pléomorphes, les myxofibrosarcomes et les sarcomes indifférenciés sont les principaux représentants de cette classe.

### **C.2 Classification selon le grade histologique**

Le type histologique seul n'est pas suffisant pour prédire l'évolution clinique de la maladie. Un système de gradation reproductible et prédictif dit « grade de la fédération nationale des centres de luttés contre le cancer (FNCLCC) » a été développé par le Pr Jean-Michel Coindre (Coindre et al., 1986; Trojani et al., 1984). Ce grade, basé sur des paramètres histologiques (la différenciation tumorale, l'index mitotique et l'étendue de la nécrose tumorale), est le facteur pronostic le plus significatif de survie sans métastases (Coindre et al., 1996). Il n'est toutefois pas applicable à tous les types histologiques de sarcomes comme notamment les angiosarcomes, les sarcomes à cellules claires ou encore les sarcomes épithélioïdes.



(Coindre et al., 1996)

*Figure 4 : Courbe de survie suivant le grade histologique, la taille et la profondeur de la tumeur*

(Basé sur une cohorte de 546 patients. **groupe 1** : grade 1 et grade 2 (superficiel) ; **groupe 2** : grade 2 (profond) et grade 3 (superficiel) ; **groupe 3** : grade 3 (profond) et taille de la tumeur < 10 cm ; **groupe 4** : grade 3 (profond) et taille de la tumeur > 10 cm)

### C.3 Classification selon le stade

Au-delà des caractéristiques intrinsèques de la tumeur, une stadification tumorale est établit selon la classification TNM (tumeur-ganglion-métastase) de l'American Joint Cancer Committee (AJCC) et de l'Union internationale contre le cancer (UICC). Ce modèle, développé par le chirurgien français Pierre Denoix dans les années 1940, s'applique à l'ensemble des tumeurs solides. Il se base sur l'ensemble des paramètres histologiques et cliniques qui sont le grade, la taille et l'extension de la tumeur primitive, l'envahissement ganglionnaire lymphatique régional et la présence de métastases (American Joint Committee on Cancer, 2017).

Stade	Tumeur	Ganglion	Métastase	Grade
Stade IA	T1a	N0	M0	G1
	T1b	N0	M0	G1
Stade IB	T2a	N0	M0	G1
	T2b	N0	M0	G1
Stade IIA	T1a	N0	M0	G2, G3
	T1b	N0	M0	G2, G3
Stade IIB	T2a	N0	M0	G2
	T2b	N0	M0	G2
Stade III	T2a, T2b	N0	M0	G3
	T1-2	N1	M0	G1-3
Stade IV	T1-2	N0-1	M1	G1-3

T1	Tumeur ≤ 5cm
T1a	Tumeur superficielle
T1b	Tumeur profonde
T2	Tumeur ≥ 5cm
T2a	Tumeur superficielle
T2b	Tumeur profonde
N0	Pas de ganglions envahis
N1	Ganglions envahis
M0	Pas de métastases à distance
M1	Métastases à distance

*Tableau 2 : Stade TNM selon l'AJCC/UICC (2010)*

## D. Prise en charge thérapeutique

### D.1 Sarcomes des tissus mous localisés

La chirurgie est le traitement de référence des sarcomes localisés. Cette chirurgie doit être planifiée après avoir obtenu une certitude diagnostique grâce à une biopsie préalable et après discussion en réunion pluridisciplinaire. Suivant la difficulté de l'acte chirurgical, elle peut être précédée ou suivie d'un traitement par chimiothérapie ou radiothérapie en fonction des cas.

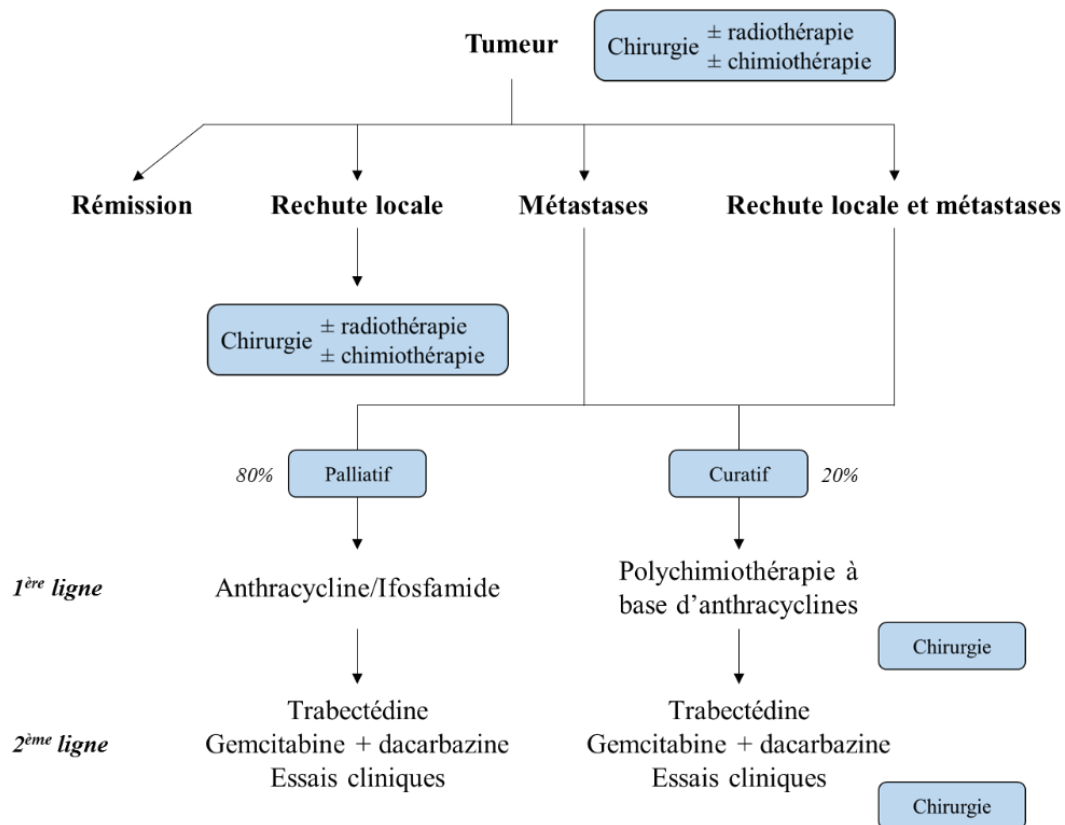
### D.2 Sarcomes des tissus mous métastatiques

La chimiothérapie est le traitement de référence des patients atteints de sarcome des tissus mous métastatiques.

La doxorubicine (un inhibiteur de la topoisomérase II) représente le standard de 1<sup>ère</sup> ligne de traitement (Antman et al., 1993). D'autres agents cytotoxiques comme l'ifosfamide (un agent alkylant), la trabectedine (un antinéoplasique alcaloïde), la gemcitabine (un antimétabolite) ou l'éribuline (un antinéoplasique) sont utilisés en routine clinique (García-Del-Muro et al., 2011; Le Cesne et al., 2012). En 2007, la trabectedine (yondelis<sup>TM</sup>) a été approuvée par l'EMA, l'agence européenne des médicaments. En 2016, suite à la validation d'un essai de phase III (essai visant à comparer le nouveau médicament aux traitements standards) intégrant

des patients atteints de LMS avancés et de liposarcomes (Demetri et al., 2016), la FDA (*Food and Drug Administration*) des Etats-Unis a également approuvé ce médicament.

Le pazopanib, un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant en particulier VEGFR2, est la seule thérapie ciblée à avoir obtenue une autorisation de mise sur le marché pour la prise en charge des patients atteints de sarcome des tissus mous (Van der Graaf et al., 2012).



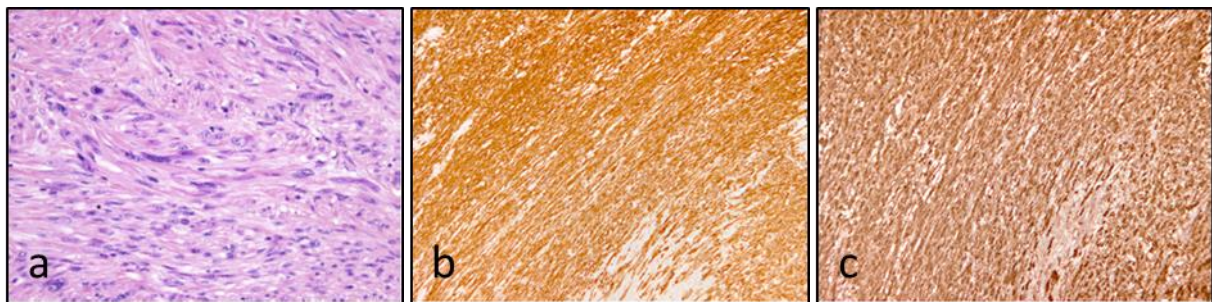
(Le Cesne and Reichardt, 2015)

*Figure 5 : Schéma général de la prise en charge des tumeurs des tissus mous*

## Chapitre 2 – Les léiomyosarcomes

### A. Généralités

Les léiomyosarcomes (LMS) sont des sarcomes caractérisés par une différenciation musculaire lisse représentant jusqu'à 15 % des STM (Neuville et al., 2013). Leur analyse histologique montre des faisceaux de cellules fusiformes entrecroisés ayant un cytoplasme éosinophile abondant et un noyau allongé hyperchromatique. L'étude immunohistochimique de la présence cytoplasmique de la H-caldesmone ou plus récemment de la transgeline, des protéines impliquées dans la contraction des cellules musculaires lisses, est souvent un complément utile pour confirmer la différenciation musculaire lisse de la prolifération cellulaire. En effet, la transgeline a été décrite comme étant un nouveau marqueur de diagnostic pour distinguer les léiomyosarcomes différenciés des peu différenciés dans lesquels la caldesmone est négative (Robin et al., 2013; Tawfik et al., 2014). Les cellules tumorales expriment également l'actine musculaire lisse et la desmine mais ces anticorps sont moins spécifiques, pouvant être exprimés dans d'autres types tumoraux.



(Robin et al., 2013)

*Figure 6 : Photos représentatives de léiomyosarcomes (x40) : coloration à l'hématoxyline éosine safran (a), expression de la caldesmone (b) et de la transgeline (c)*

### B. Epidémiologie

L'âge médian au diagnostic est de 55-60 ans avec un sex-ratio légèrement déséquilibré en faveur des femmes (Goldblum et al., 2014). Quelques cas ont été décrits chez des enfants, le plus souvent en association au virus de l'Epstein Baar chez des individus porteurs du VIH (McClain et al., 1995). Le risque de rechute métastatique est d'environ 40 % avec un taux de survie à 5 ans de 64 % (Fletcher et al., 2013).

Le pronostic des LMS est défini par la taille et le degré d'extension initial de la tumeur ainsi que par le grade histologique de la FNCLCC. Il existe également des différences de pronostic selon la localisation, les léiomyosarcomes du rétropéritoine étant de plus mauvais pronostic que les léiomyosarcomes des extrémités. Il n'existe aucun argument en faveur d'une transformation possible de léiomyome (tumeur bénigne à différenciation musculaire lisse) en léiomyosarcome et il est actuellement accepté que les LMS sont des tumeurs qui surviennent *de novo* (Goldblum et al., 2014).

## **C. Localisation des léiomyosarcomes**

Les LMS des tissus mous surviennent au niveau de quatre sites anatomiques distincts que sont le rétropéritoine, les vaisseaux sanguins, les membres et la peau (Abbasi et al., 2015; Hager et al., 2017; Nyström et al., 2017; Slimane et al., 2016).

### **C.1 Les LMS rétropéritonéaux**

Ces tumeurs sont en général bien différenciées et se présentent comme des masses volumineuses avec une taille moyenne au moment de la découverte d'environ 20 cm (Gronchi et al., 2016). Elles surviennent dans les deux tiers des cas chez les femmes. La complexité anatomique du rétropéritoine et la proximité des tumeurs des structures vitales limitent les possibilités d'exérèse complète. De plus, même dans les LMS rétropéritonéaux complètement réséqués, la récurrence locorégionale est fréquente, atteignant jusqu'à 50 % des cas (Nussbaum et al., 2016). Ainsi, leur pronostic est péjoratif avec 70-80 % de décès à 5 ans (Gronchi et al., 2013).

### **C.2 Les LMS cutanés superficiels**

Les léiomyosarcomes de la peau, aussi appelé LMS cutanés superficiels, sont des tumeurs rares, représentant 2-3 % de l'ensemble des sarcomes avec une incidence globale de 0,04 % (Holst et al., 2002). Ces LMS sont présent chez les personnes de tous les âges mais avec un pic situé entre 60 et 70 ans. Les hommes sont généralement sur-représentés avec un rapport d'environ 3:1. Des travaux antérieurs montrent que ces tumeurs peuvent être divisées en deux sous-types : les LMS intradermiques qui auraient pour origine les muscles arrecteurs du poil et les LMS sous-cutanés d'origine vasculaire (Fields and Helwig, 1981). Ces deux sous-types présentent les mêmes caractéristiques morphologiques telles que la présence de cellules

fusiformes à différenciation musculaire lisse, une petite taille (< 5 cm), un taux variable de pléomorphisme nucléaire, une présence de mitoses et la présence variable de nécrose. Les léiomyosarcomes intradermiques ont un excellent pronostic alors que les formes sous-cutanées peuvent être associées à des récurrences locales ou métastatiques (Kraft and Fletcher, 2011; Miettinen and Fetsch, 2006).

### **C.3 Les LMS des membres**

Les léiomyosarcomes des extrémités ou des membres représentent seulement 10 % des sarcomes des membres. Malgré un traitement locorégional bien conduit, une récurrence métastatique survient dans 40 % des cas et le taux de survie à 5 ans est de 65 % (Farshid et al., 2002).

### **C.4 Les LMS d'origine vasculaire**

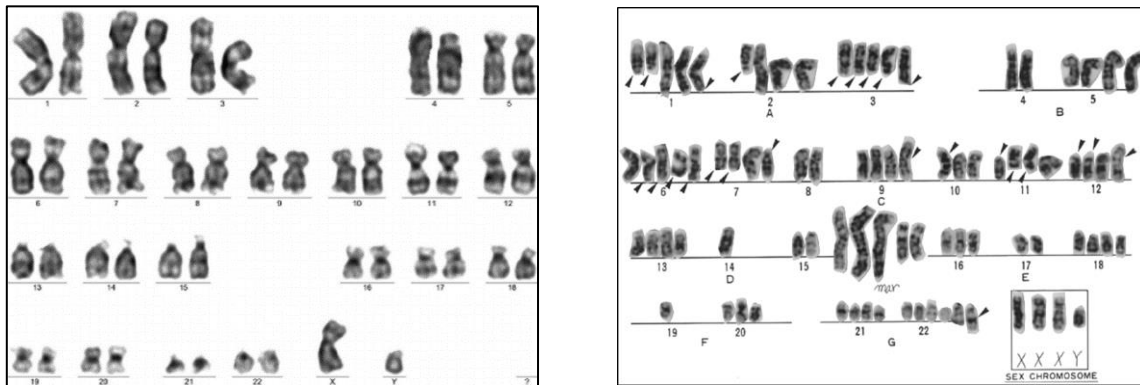
Les léiomyosarcomes d'origine vasculaire sont des tumeurs agressives rares observées de façon prédominante chez les femmes avec un rapport de 3:1. Ils représentent 0,5 % de tous les sarcomes des tissus mous de l'adulte et le taux de survie des patients à 5 ans est d'environ 45 % (Laskin et al., 2010). Une résection complète de ces tumeurs reste le traitement le plus efficace. Seulement une centaine de patients atteints de LMS d'origine vasculaire ont été rapportés dans la littérature et la grande majorité de ces tumeurs proviennent de la veine cave inférieure et des veines larges des extrémités inférieures (Italiano et al., 2010). Dans ces cohortes de patients, de nombreuses rechutes locales avec métastases ont été observées principalement au niveau des poumons et du foie.

## **D. Les altérations génomiques connues**

Les études de cytogénétique conventionnelle (caryotypage) et moléculaire (FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) et CGH (*Comparative Genomique Hybridization*)) de même que les techniques de séquençage de nouvelle génération ont permis de mieux caractériser les altérations génétiques des léiomyosarcomes.

### **D.1 Les altérations cytogénétiques**

L'analyse cytogénétique des léiomyosarcomes a montré l'existence d'aberrations chromosomiques complexes non récurrentes (Guillou and Aurias, 2010).



(Miyajima et al., 2003)

*Figure 7 : Caryotype représentatif d'un individu sain (gauche) et atteint d'un LMS (droite)*

Les régions des chromosomes les plus fréquemment rapportées comme étant altérées sont des pertes des régions 10q11-21.2 et 13q14.3-21.1 et des gains des régions 5p14-15, 8q24, 15q25-26 et 17p11-12 (Barretina et al., 2010; Wang et al., 2001). Les régions chromosomiques perdues en 10q et 13q contiennent respectivement les gènes suppresseurs de tumeurs *PTEN* et *RB1*. Une perte du gène *PTEN* associée à un gain de la *Cycline A* peut être associée à des LMS agressifs (Hu et al., 2005). L'analyse des composants de la voie RB1/cycline D1 dans les léiomyosarcomes a révélé des altérations chez 90 % des patients et a été corrélée à un mauvais pronostic (Meza-Zepeda et al., 2006).

D'autres altérations cytogénétiques de nombre tels que des gains des régions chromosomiques 6q, 8q, 16p, 17p ou une trisomie 9 et des pertes des régions 1p36 et 8p21 ont été décrites dans des séries limitées (El-Rifai et al., 1998; Larramendy et al., 2006; Wang et al., 2003). Celles-ci ont été parfois associées à des caractéristiques anatomo-cliniques mais aucun gène cible de ces remaniements n'a été clairement identifié.



Altérations cytogénétiques	Chromosomes touchés	Observations
Gain	5p14-15	LMS de haut-grade
	6q 8q24 15q25 16p 17p	Fréquent dans les tumeurs de grandes tailles (> 20cm)  Fréquent dans les tumeurs de petites tailles (< 5cm)
Perte	1p36 8p21  10q 13q12 13q14-21	Haut risque de métastases  LMS de haut-grade, réduction du temps de survie à 5 ans des patients
Amplification	17p11	Fréquent dans les tumeurs de petites tailles (< 5cm)

(Yang et al., 2009)

*Tableau 3 : Les aberrations génétiques fréquentes dans les LMS***D.2 Les altérations moléculaires**

Peu de travaux analysant les altérations moléculaires des LMS par l'utilisation des techniques de séquençage Sanger ou de séquençage nouvelle génération ont été rapportés dans la littérature. L'institut Bergonié promeut actuellement un programme, dans le cadre du consortium ICGC (*International Cancer Genome Consortium*), destiné à séquencer le génome et le transcriptome de plus de 150 LMS afin d'en préciser les caractéristiques moléculaires. Les données de la littérature montrent toutefois l'existence de plusieurs altérations récurrentes.

### D.2.1 La voie TP53

La voie régulatrice p14/MDM2/TP53, aussi nommée voie TP53, est bien connue pour son rôle antitumoral. Elle induit l'arrêt du cycle cellulaire, la senescence ou l'apoptose des cellules cancéreuses (Sherr and McCormick, 2002). La majorité des léiomyosarcomes est caractérisée par une altération de cette voie TP53 résultant d'une inactivation bi-allélique du gène *TP53* (50 % des LMS) ou d'une perte d'expression de p14 (un activateur de la voie TP53) suggérant un rôle important de cette voie dans la tumorigenèse des LMS (Pérot et al., 2010).

### D.2.2 ATRX

La prolongation alternative des télomères ou ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*) est un mécanisme qui maintient les télomères dans les sarcomes des tissus mous (Henson et al., 2005). Ce phénomène a été associé à la perte d'expression de la protéine ATRX (*Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked*) dans 15 % des cas de léiomyosarcomes (Liau et al., 2015).

### D.2.3 RB1

*RB1* est un gène suppresseur de tumeur qui exerce un contrôle négatif du cycle cellulaire. La perte de ce gène a été associée à la tumorigenèse des sarcomes et plus précisément à celle des léiomyosarcomes (Stratton et al., 1989). Les patients atteints de rétinoblastomes héréditaires dus à une perte hétérozygote du gène *RB1* développent des léiomyosarcomes avec une fréquence élevée (Francis et al., 2012). La perte d'expression de la protéine p16<sup>INK4A</sup> (un activateur de RB1) suite à une méthylation de son promoteur a été également corrélée à l'apparition de LMS (Kawaguchi et al., 2003).

### D.2.4 MYOCARDIN

La majorité des léiomyosarcomes est caractérisée par l'amplification d'un gène codant pour la MYOCARDIN (*MYOCD*), un régulateur du développement et de la différenciation des muscles lisses. Des travaux ont rapporté que le gène *MYOCD* est hautement amplifié dans les LMS du rétropéritoine (Pérot et al., 2009). Ces études ont également suggéré que la *MYOCD* induit la différenciation des muscles lisses et favorise la migration cellulaire des léiomyosarcomes (Kimura et al., 2010).

### D.2.5 La voie PI3K/mTOR

Les LMS sont caractérisés par des pertes fréquentes d'expression de PTEN (un régulateur négatif de la voie de signalisation PI3K/mTOR). Elles résultent de délétion ou de méthylation du promoteur du gène *PTEN* survenant dans plus de 55 % des cas (Zhang et al., 2014). Cette inactivation jouerait un rôle majeur dans la tumorigenèse comme suggéré par des travaux précliniques mettant en évidence que l'inactivation de PTEN entraîne l'apparition de tumeurs à différenciation musculaire lisse avec une activation constitutive de la voie PI3K/mTOR (Hernando et al., 2007).

Voies de signalisation	Altérations	Fréquences
TP53	Mutation ou délétion homozygote de TP53 Délétion homozygote de p14 Amplification de MDM2	65 % 15 % 10 %
RB1	Mutation ou délétion hétérozygote de RB1 Délétion hétérozygote ou méthylation de p16 <sup>INK4A</sup>	45 % 15 %
ALT	Mutation d'ATRAX	20 %
PI3K/mTOR	Méthylation ou délétion homozygote de PTEN Mutation de PI3K	55 % 10 %
Différenciation des cellules musculaires lisses	Amplification de MYOCD	30 %

(Agaram et al., 2016; Lee et al., 2017)

*Tableau 4 : Les altérations moléculaires fréquentes observées dans les LMS*

## **E. Traitements des LMS**

La prise en charge thérapeutique des patients atteints de LMS ne diffère pas de celle des autres sarcomes des tissus mous. Au stade localisé, la chirurgie associée à la radiothérapie est le traitement de référence des tumeurs de localisation profonde (sous-aponévrotique). Au stade métastatique, la chimiothérapie est le traitement standard. Plusieurs médicaments peuvent être utilisés dans ce contexte, tels que la doxorubicine, la trabectédine, la gemcitabine ou le pazopanib. D'une manière générale, les LMS seraient caractérisés par un meilleur pronostic après traitements en termes de survie globale que les STM (Savina et al., 2017). Au stade

métastatique, les LMS présenteraient une sensibilité plus importante à la gemcitabine qu'aux autres médicaments (Pautier et al., 2012).

## Chapitre 3 - La voie de signalisation PI3K/mTOR dans les tumeurs humaines

### A. Généralités

La voie de signalisation PI3K/mTOR est une voie de signalisation intracellulaire qui répond aux hormones et facteurs de croissance. Ces stimuli sont reconnus par un récepteur membranaire et activent une cascade de phosphorylation de plusieurs protéines intracellulaires dont les trois principales que sont PI3K (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase*), AKT et mTOR (*Mammalian Target Of Rapamycin*) afin d'assurer différentes fonctions cellulaires (Zhang et al., 2007). Dans les cellules saines, ces fonctions sont très variées et incluent notamment la régulation de la survie et la différenciation cellulaire, de la synthèse protéique, de la prolifération, de l'angiogenèse, du métabolisme et de la migration cellulaire (Vanhaesebroeck et al., 2010). Cette voie constitue un centre d'intérêt important dans l'étude de l'oncogenèse car la plupart des protéines la constituant sont des gènes suppresseurs de tumeurs ou des proto-oncogènes dont la mutation peut favoriser le développement d'un processus tumoral.

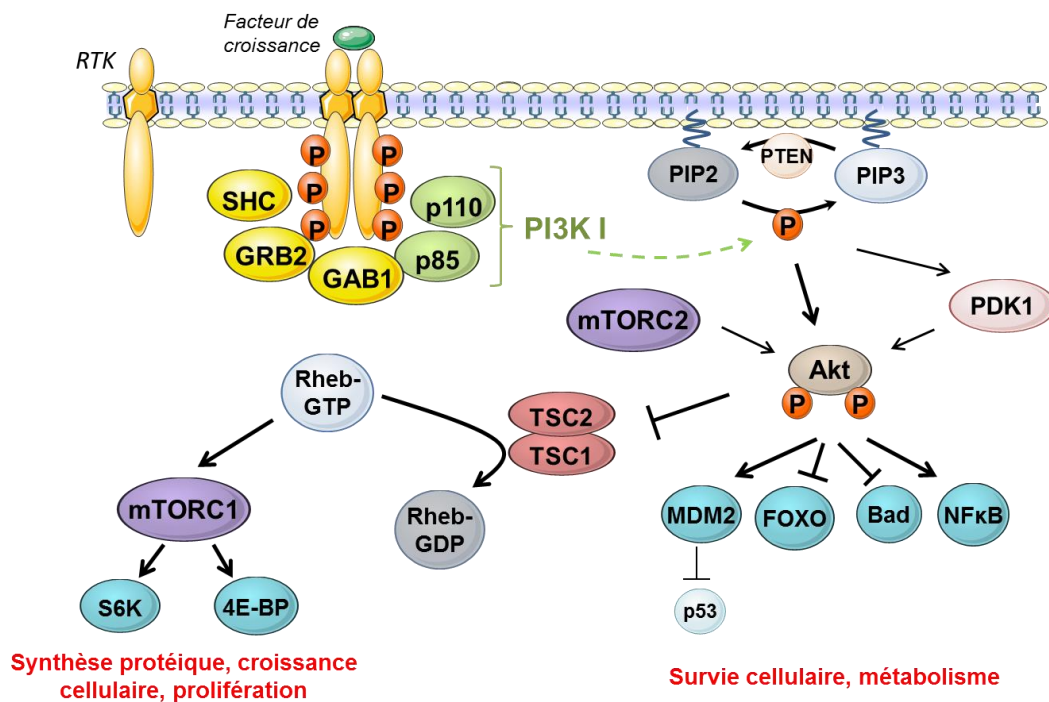


Figure 8 : La voie de signalisation PI3K/mTOR et ses fonctions cellulaires

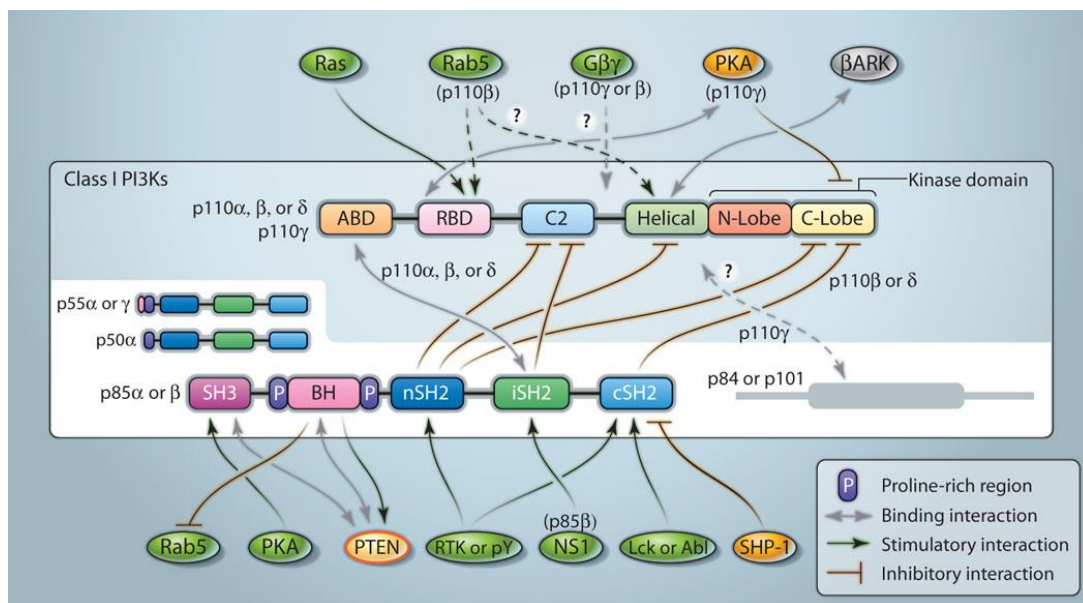
## B. Les composantes de la voie PI3K/mTOR

### B.1 La PI3K de classe I

Les protéines PI3K sont regroupées en trois classes (I, II, III) qui diffèrent selon leur structure, leur spécificité de substrat, leur distribution tissulaire et leurs mécanismes d'activations. Les trois classes peuvent phosphoryler les phosphoinositides en position 3 du noyau inositol mais seule la kinase de classe I est capable de générer du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>) nécessaire à l'activation de la voie PI3K/mTOR (Backer, 2008; Falasca and Maffucci, 2012).

#### B.1.1 Structure et fonctions

La PI3K de classe I est une protéine hétérodimérique qui se compose d'une sous-unité régulatrice et d'une sous-unité catalytique (p110) qui produit le second messager PIP<sub>3</sub>. Au sein de cette classe se distingue généralement deux groupes, la classe IA (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  et p110 $\delta$ ) et la classe IB (p110 $\gamma$ ) sur la base de leur sous-unité régulatrice.



(Vadas et al., 2011)

*Figure 9 : Représentation schématique des sous-unités de la PI3K de classe I*

Les sous-unités catalytiques partagent de façon commune un domaine ABD (*Adaptator Binding Domain*) qui facilite la liaison avec la protéine régulatrice, un domaine RBD (*RAS-Binding Domain*), un domaine C2 qui facilite l'amarrage à la membrane plasmique, un domaine

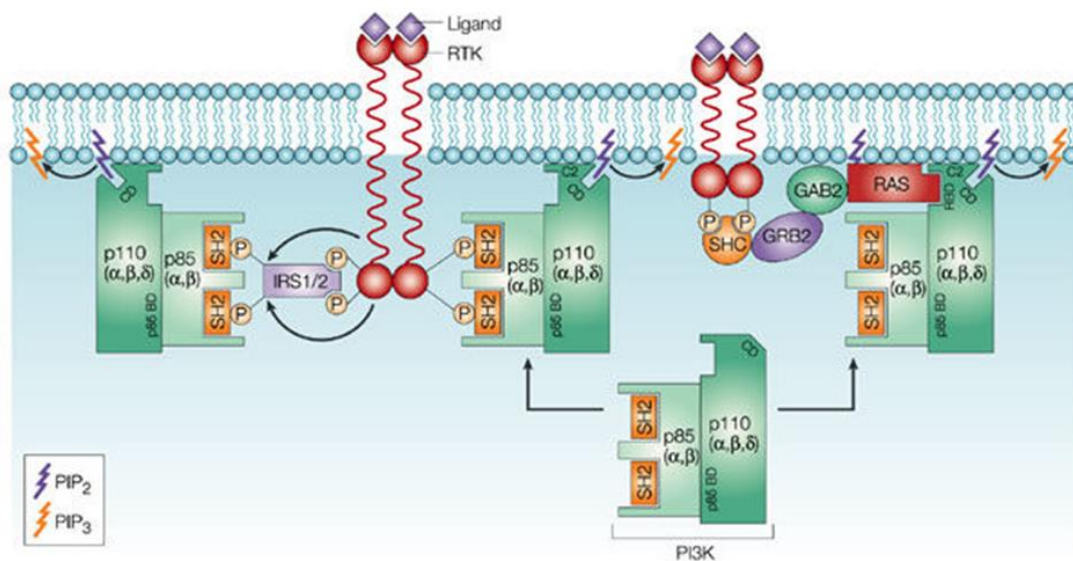
en alpha-hélice et une région carboxy-terminale qui est totalement affectée à la fonction kinase de la protéine (Scheeff and Bourne, 2005). Les sous-unités catalytiques de classe IA sont associées et activées par les sous-unités p85 ou leurs variants (p85 $\alpha$ , P55 $\alpha$ , P50 $\alpha$ , P85 $\beta$  et P55 $\gamma$ ). Ces sous-unités contiennent deux domaines SH2 (*Src Homology 2*) qui assurent la fixation à la sous-unité p110. Dans les p85 $\alpha$  et p85 $\beta$ , les domaines SH2 sont précédés par un domaine SH3, un domaine BH (*Bcl-2 Homology*) et deux régions riches en proline (Maier et al., 1999). La p110 $\gamma$  de la Classe IB s'associe aux sous-unités régulatrices p84 ou p101 qui ne possèdent pas de domaines reconnaissables. De par leurs différences structurales, les PI3K de classe IA sont activées en aval des récepteurs tyrosines kinases (RTK) et de la protéine RAS alors que celles de classe IB ne peuvent être activées qu'en aval des récepteurs couplés à des protéines G (RCPG) et de la protéine RAS (Kurosu et al., 1997).

### B.1.2 Activation et régulation de la PI3K de classe I

Le mécanisme d'activation des PI3K de classe IA par les RTK est le mieux décrit à ce jour. Ces récepteurs sont des protéines qui possèdent un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire. Des facteurs de croissance (PDGF, EGF, IGF) et des cytokines (interleukines) vont venir se fixer au niveau du domaine extracellulaire et entraîner le rapprochement de deux récepteurs, c'est-à-dire leur dimérisation. L'activation du domaine tyrosine-kinase, grâce à une série de transphosphorylations au niveau de leur partie intracellulaire, va permettre l'amarrage de certaines protéines de signalisation par leur domaine SH2, notamment la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K ou ses variants (Marone et al., 2008). Aussi, des molécules adaptatrices possédant un domaine SH2 comme les protéines IRS1/2, GAB1 ou LAT peuvent se fixer sur les RTK et servir de relais entre ces dernières et la p85 de la PI3K (Maeno et al., 2012; Onishi-Haraikawa et al., 2001; Shim et al., 2011). Cette liaison au récepteur lève alors l'inhibition de la sous-unité catalytique p110 exercée par la p85 et permet la phosphorylation du substrat phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP<sub>2</sub>).

Les protéines G représentent les principaux effecteurs des RCPG. Une fois le récepteur activé, la protéine G se dissocie en deux sous-unités G $\alpha$  et G $\beta\gamma$ . Seule la PI3K de classe IB est activée par la sous-unité effectrice G $\beta\gamma$  des RCPG. Au contraire des RTK, la sous-unité catalytique p110 $\gamma$  peut être activée directement par la G $\beta\gamma$  (Stephens et al., 1997). Cependant, l'association avec sa sous-unité régulatrice permet à la p110 $\gamma$  d'être recrutée au niveau de la membrane plasmique et ainsi d'assurer une activation complète de la protéine PI3K (Brock et al., 2003).

De nombreuses petites GTPases (des hydrolases qui catalysent le GTP en GDP), appartenant à la superfamille Ras, sont capables d'interagir et de réguler directement les PI3K de classe I grâce au domaine RBD présent dans toutes les sous-unités catalytiques (Pacold et al., 2000). De nombreuses études suggèrent que Ras est indispensable à l'activation des PI3K. En effet, il a été rapporté qu'un défaut dans le domaine RBD altérerait significativement la phosphorylation de la protéine AKT et par conséquent la voie PI3K/mTOR (Gupta et al., 2007; Orme et al., 2006).



(Vivanco and Sawyers, 2002)

*Figure 10 : Modèle d'activation de la PI3K*

*In fine*, la génération des seconds messagers lipidiques par la PI3K, les PIP<sub>3</sub>, permettent le recrutement, au niveau de la membrane plasmique, de plusieurs protéines de signalisation possédant des domaines PH (*Plekstrin Homology*), dont la protéine AKT (Courtney et al., 2010). Les niveaux de PIP<sub>3</sub> sont à peine détectables dans des conditions de croissance non stimulée dans des cellules saines et ils sont étroitement contrôlés en raison des effets combinés d'une régulation rigoureuse de PI3K et de l'action de plusieurs phosphatases à PIP<sub>3</sub> (PTEN, SHIP1 et SHIP2).

### B.1.3 PTEN

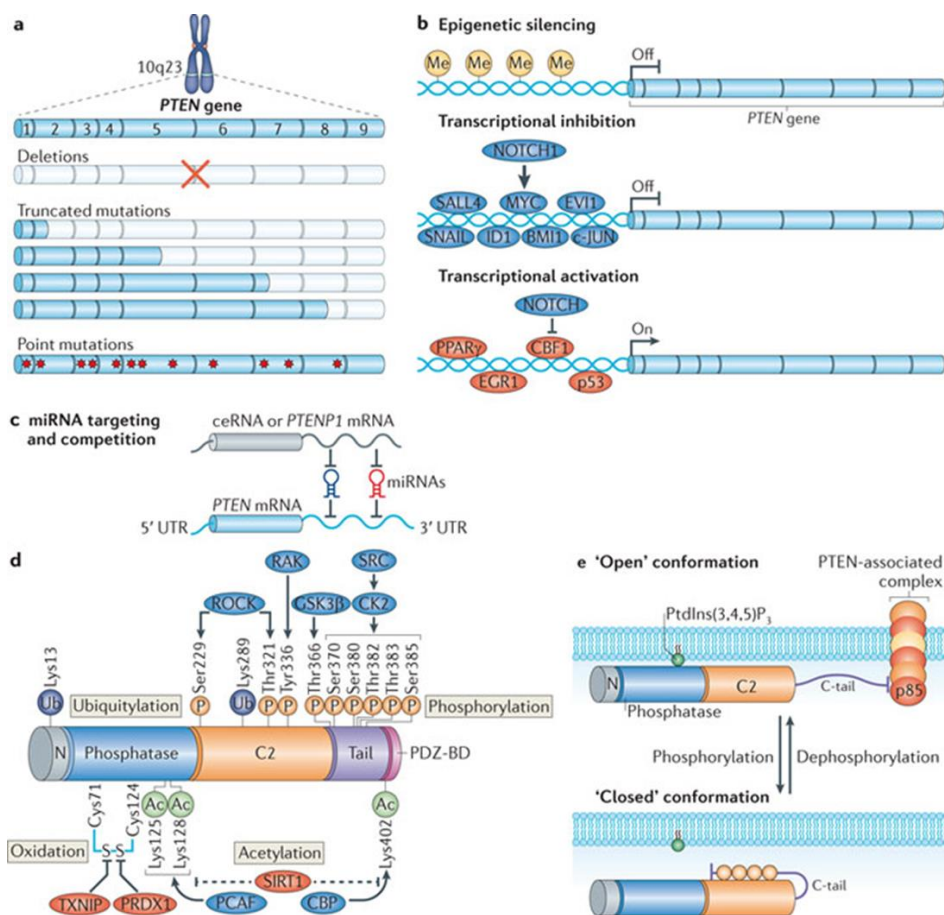
La protéine PTEN (*Phosphatase and Tensin homologue*), localisée sur la région chromosomique 10q23, est une phosphatase à double spécificité qui possède une activité



tyrosine kinase et une activité lipide phosphatase (Maehama and Dixon, 1998). D'un point de vue structural, PTEN est composé de deux domaines majeurs, un site catalytique et un domaine C2 qui lui permet de s'adhérer à la membrane plasmique près de son substrat. La fonction principale de PTEN est de déphosphoryler en position 3 le noyau inositol des phosphoinositides et de créer le PIP<sub>2</sub>. Son activité lipide phosphatase est essentielle pour son rôle de régulateur de la voie PI3K/mTOR et sa fonction suppresseur de tumeur (Shi et al., 2012). *In vivo*, un défaut dans le site catalytique des lipides de PTEN suffit à lever l'inhibition exercée sur le cycle cellulaire en phase G1 et à induire des tumeurs. Son activité protéine phosphatase, quant à elle, a été décrit comme régulateur de la motilité cellulaire, en inactivant des protéines comme FAK (*Focal Adhesion Kinase*), et de la migration cellulaire (Tamura et al., 1999). La protéine PTEN possède également des activités indépendantes de son domaine phosphatase par exemple en interagissant physiquement avec les protéines CENP-C du centromère pour maintenir une stabilité des chromosomes et assurer l'intégrité du génome (Shen et al., 2007). Elle peut également intervenir dans la régulation du cycle cellulaire, le maintien de la polarité cellulaire ou encore la sénescence (Song et al., 2012).

La perte fonctionnelle de PTEN est une anomalie retrouvée dans certains syndromes congénitaux, tels que la maladie de Cowden ainsi que dans plusieurs tumeurs malignes solides. PTEN est l'un des gènes suppresseurs de tumeur les plus mutés, et si elle ne l'est pas, elle est souvent sous-réglée ou inhibée par de nombreux mécanismes. En effet, des régulations épigénétiques peuvent par exemple avoir lieu avec le facteur de transcription SALL4 (*Sal-Like protein 4*) qui va permettre le recrutement d'un complexe capable d'hypermétyler le promoteur du gène *PTEN* et de le réduire sous silence (Lu et al., 2009). Différentes études ont également montré que les facteurs de transcription SNAIL et ID1 (*DNA-binding 1*) sont capables de réguler négativement le gène *PTEN* en entrant en compétition avec son activateur transcriptionnel p53 (Escrivà et al., 2008). Il a été rapporté également d'autres régulations transcriptionnelles du gène *PTEN* par les protéines NOTCH, NF-κB (*Nuclear Factor-kappa B*) ou encore c-JUN (Hettinger et al., 2007; Whelan et al., 2007; Xia et al., 2007). Des régulations post-transcriptionnelles peuvent aussi avoir lieu par le biais des microARN (miARN). En effet, ces dernières années, de nombreux miARN ont été mis en évidence dont les miR-17, miR-19 ou miR-21, capables d'inhiber PTEN et d'induire de nombreux cancers et maladies métaboliques (Mavrakis et al., 2010; Meng et al., 2007). Quant aux régulations post-traductionnelles de PTEN, elles sont plus nombreuses et plus complexes que les régulations post-transcriptionnelles. Par exemple, PTEN peut être phosphorylée au niveau de ses domaines C2 et carboxy-terminal pour réguler son activité. Des phosphorylations du domaine terminal

aux positions Ser380, Thr382, Thr383 ou Ser385 vont stabiliser la protéine dans une conformation « fermée » qui va réduire sa localisation à la membrane plasmique et donc réduire son activité de phosphatase sur PIP<sub>3</sub> (Vazquez et al., 2001). Par contre, des phosphorylations aux positions Ser229 et Thr321 par la protéine ROCK (*RHOA-associated protein Kinase*) sur le domaine C2 activera la protéine PTEN (Li et al., 2005). L'activité de PTEN peut aussi être inhibée par acétylation et oxydation. En présence de facteurs de croissance, l'histone acétyltransférase PCAF (*P300/CBP-Associated Factor*) acétyle PTEN sur les résidus lysine 125 et 128 dans le domaine catalytique et inhibe la liaison au PIP<sub>3</sub> (Okumura et al., 2006). L'oxydation par les ROS (*Reactive Oxygen Species*) de la cystéine 124 du domaine catalytique aura le même effet (Lee et al., 2002). Des études ont aussi montré que le domaine catalytique de PTEN peut être « étiqueté » par une ou plusieurs ubiquitines au niveau de la membrane plasmique pour inhiber son activité catalytique, la délocaliser dans le noyau ou induire sa dégradation par le protéasome (Maccario et al., 2010).



(Song et al., 2012)

*Figure 11 : Les mécanismes de régulation de la phosphatase PTEN*

(Régulation de PTEN au niveau génétique (a), transcriptionnel (b), post-transcriptionnel (c), post-traductionnel (d) ou conformationnel (e))

### B.1.4 SHIP1 et SHIP2

La famille des protéines SHIP (*SH2 domain-containing Inositol 5'-Phosphatase*) est composée de deux membres, SHIP1 et SHIP2. Ces protéines, localisées sur le gène 2q36-q37.1, agissent aussi sur les niveaux de PIP<sub>3</sub> mais au contraire de PTEN, elles hydrolysent le phosphate présent en position 5 du noyau inositol créant ainsi un phosphatidylinositol-3,4-diphosphate (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>). Le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> peut fonctionner comme un second messager (comme PIP<sub>3</sub>) pour recruter les protéines de signalisation possédant des domaines PH comme AKT (Gupta et al., 2007). Donc, même si PTEN et les deux phosphatases SHIP1 et SHIP2 réduisent le niveau de PIP<sub>3</sub>, seul PTEN semble être responsable du contrôle des effets mitotiques des phosphoinositides. En effet, une mutation inactivatrice de la protéine PTEN induit des tumeurs chez la souris au contraire d'une inactivation génétique de SHIP1. Par contre, l'inactivation de SHIP1 chez la souris induit des syndromes myéloprolifératifs indiquant que les PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> peuvent agir comme agent mitogène (Helgason et al., 2000). Par ailleurs, les phosphatases SHIP ont été décrites dans la régulation de la voie RAS/MAPK (Lakhanpal et al., 2010) ou dans des pathologies telles que l'obésité (Sleeman et al., 2005) et le diabète (Clément et al., 2001).

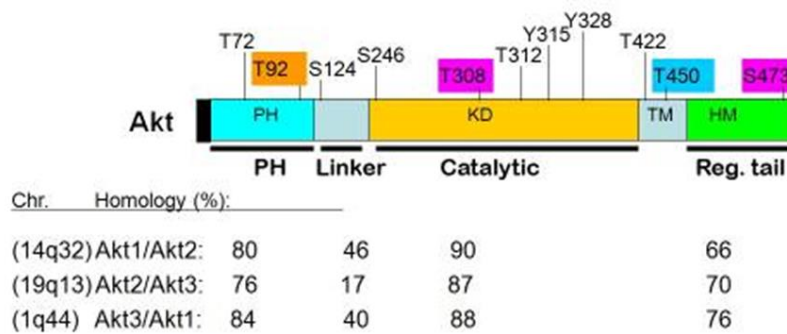
## **B.2 La protéine kinase AKT**

### B.2.1 Structure et fonctions

La protéine AKT, appelée aussi protéine PKB (*Protein Kinase B*), est une sérine/thréonine kinase constituée d'un domaine PH amino terminal, d'un domaine catalytique central et d'un petit domaine régulateur contenant un motif hydrophobe en extrémité carboxy-terminale. Chez les mammifères, il existe trois isoformes d'AKT (AKT1, AKT2 et AKT3) hautement conservées (plus de 80 % d'homologie de séquence), codées par trois chromosomes différents, le chromosome 14q32 pour *AKT1*, le 19q13 pour *AKT2* et le 1q44 pour *AKT3* (Chan et al., 1999). AKT1 est l'isoforme présente dans la majorité des tissus tandis que AKT2 sera l'isoforme préférentiellement exprimée dans les tissus sensibles à l'insuline (tissus gras, muscle squelettique) et AKT3, dans le cerveau et les testicules (Hanada et al., 2004). Les trois isoformes partagent un site catalytique similaire avec plus de 80 kinases qui elles-mêmes sont régulées par des seconds messagers comme le calcium ou les phosphoinositides et qui sont aussi impliquées dans des voies de signalisation de la croissance cellulaire.

Le domaine PH d'AKT joue un rôle essentiel dans la translocation de la protéine vers la membrane plasmique puisqu'il a pour fonction d'interagir avec les produits de la membrane

lipidique comme le PIP<sub>3</sub> produit par la PI3K. Des études biochimiques ont révélé que ce domaine PH peut se fixer, avec la même affinité, sur le PIP<sub>2</sub> et le PIP<sub>3</sub> (Frech et al., 1997). Le domaine kinase possède une haute similarité avec d'autres kinases comme la PKA et PKC (*Protein Kinase A* et *C*), les « *Ribosomal protein S6 Kinase* » p70S6K et p90RSK (Peterson and Schreiber, 1999). Ce domaine possède également un résidu thréonine en position 308, hautement conservé chez les mammifères, dont la phosphorylation est nécessaire pour l'activation de la protéine AKT. La région hydrophobique possède aussi un résidu conservé, une sérine en position 473, dont la phosphorylation est nécessaire pour l'activation complète d'AKT (Andjelković et al., 1997).



(Liao and Hung, 2010)

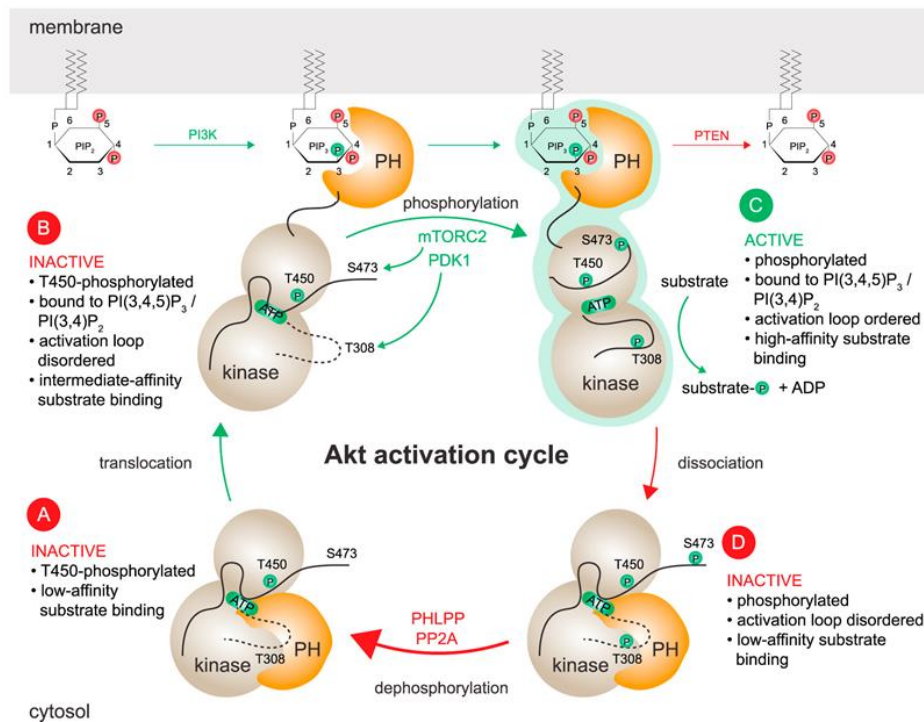
*Figure 12 : Représentation de la structure d'AKT*

### B.2.2 Activation et régulation de la protéine AKT

En l'absence de stimulation par des facteurs de croissance, dans des cellules quiescentes, les trois isoformes d'AKT sont inactives. Mais en présence de stimuli, le PIP<sub>3</sub> est formé au niveau de la membrane plasmique par la protéine PI3K et va recruter des protéines possédant un domaine PH comme AKT et PDK1 (*3-Phosphoinositide-Dependent Kinase 1*). L'interaction avec le phosphoinositide PIP<sub>3</sub> va provoquer des changements de conformation de la protéine AKT et exposer plusieurs sites de phosphorylation dont la thréonine en position 308 de son domaine catalytique et la sérine en position 473 de sa région hydrophobique (Alessi et al., 1996). PDK1, localisée à la membrane plasmique, va phosphoryler la Thr308 et permettre une activation partielle d'AKT. La stabilité de la phosphorylation de la Thr308 et l'activation complète de la protéine sont alors assurées principalement par une kinase, le complexe protéique mTORC2 (*mammalian Target Of Rapamycin Complex 2*), en phosphorylant le résidu S473 (Sarbasov et al., 2005). Une étude récente a suggéré qu'un domaine PH présent dans une des sous-unités régulatrices de mTORC2, SIN1, permet le recrutement du complexe à la

membrane plasmique et que la liaison au PIP<sub>3</sub> va activer la kinase mTOR (Liu et al., 2015). Cependant, par une série d'autophosphorylation, AKT peut également induire une phosphorylation de la S473 et permettre son activation complète (Toker and Newton, 2000). En cas de dommage à l'ADN, la protéine DNA-PK (*DNA-dependent Protein Kinase*) va préférentiellement être responsable de la phosphorylation du résidu sérine 473 mais le rôle de cette substitution n'a pas encore été clairement établi (Bozulic et al., 2008).

Le modèle largement accepté par la communauté scientifique concernant l'activation d'AKT implique que la phosphorylation et l'activité de la protéine sont indépendantes de la protéine PIP<sub>3</sub>. Or, très récemment, une étude a mis en évidence une liaison allostérique forte entre AKT et PIP<sub>3</sub> qui serait le régulateur principal du cycle d'activation de la protéine AKT (Ebner et al., 2017). En effet, les résultats suggèrent qu'AKT transfère des phosphates à ses substrats aussi longtemps qu'elle reste phosphorylée et fixée à PIP<sub>3</sub>. Cependant, dès que la protéine AKT se dissocie du PIP<sub>3</sub>, la protéine adopte sa conformation « fermée » et est alors rapidement déphosphorylée.



(Ebner et al., 2017)

*Figure 13 : Schéma du cycle d'activation de la kinase AKT*

Bien que la phosphorylation des résidus Thr308 et Ser473 soit considérée comme obligatoire pour une activation maximale de la kinase AKT, d'autres modifications post-

traductionnelles peuvent avoir lieu pour affiner le niveau d'activation de la protéine, sa localisation cellulaire ou encore la spécificité de son substrat (Guo et al., 2014). Par exemple, de nombreux sites de phosphorylation ont été recensés. Le site de la Thr450 est constitutivement phosphorylé par mTORC2 pour assurer la bonne conformation spatiale de la protéine (Facchinetti et al., 2008). Les résidus Ser477 et Thr479 sont dépendant du cycle cellulaire, notamment du complexe CDK2 (*Cyclin-Dependant protein Kinase*), et important pour améliorer l'activité d'AKT mais la phosphorylation de la Thr312 par la protéine GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*) semble plutôt l'atténuer (Gulen et al., 2012; Liu et al., 2014). Outre les phosphorylations, la kinase peut aussi être affectée par des acétylations, des méthylations, des oxydations ou des ubiquitylations (Chan et al., 2014).

### B.2.3 Les phosphatases INPP4B, PP2A et PHLPP

Après la stimulation par des facteurs de croissance, les niveaux de PIP<sub>3</sub> diminuent et l'activité de la kinase AKT est atténuée par la déphosphorylation de ses résidus par deux sérine/thréonine phosphatases. La phosphatase PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) déphosphoryle le résidu Thr308 conduisant à l'inactivation de la kinase AKT (Andjelković et al., 1996). Tandis que les protéines PHLPP1 et PHLPP2 (*PH domain Leucine-rich repeat Protein Phosphatase*) ont été décrites comme les phosphatases spécifiques du résidu S473 (Gao et al., 2005). Depuis leur découverte il y a une dizaine d'années, plusieurs études ont montré qu'une perte d'expression de ces phosphatases mène à une suractivation de la protéine AKT et est retrouvée dans de nombreux cancer (Chen et al., 2011). A noter aussi que de par sa structure, AKT peut être activée en se fixant au PIP<sub>2</sub>. La phosphatase INPP4B (*Inositol Polyphosphate-4-Phosphatase*) joue alors un rôle majeur mais indirect dans l'inactivation de la protéine puisqu'elle déphosphoryle PIP<sub>2</sub> en PIP (Fedele et al., 2010).

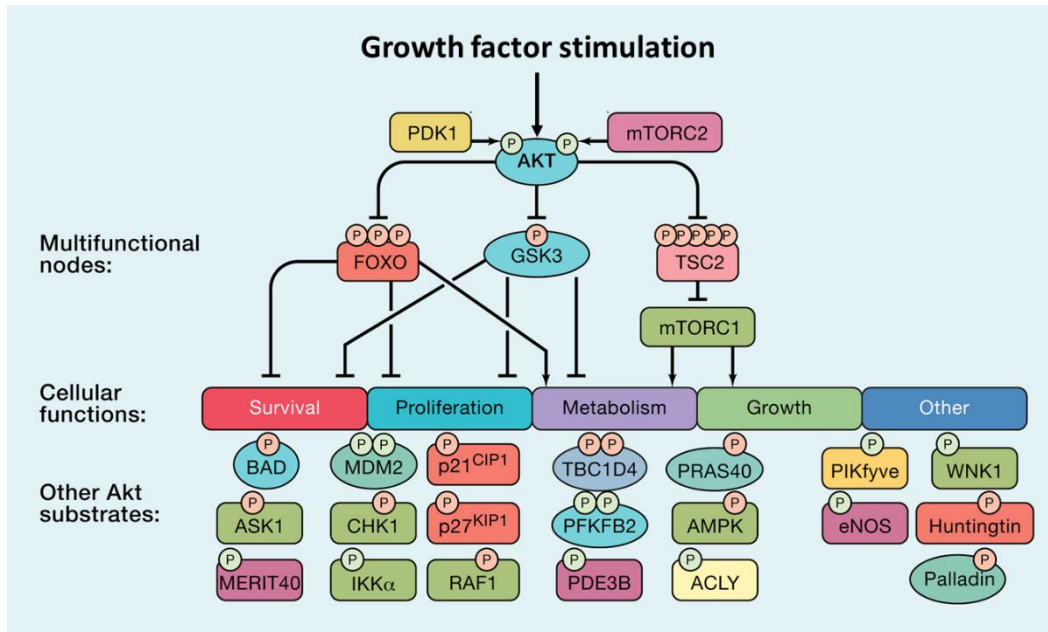
### B.2.4 Les fonctions physiologiques d'AKT

Dans la littérature, il a été rapporté bien plus d'une centaine de substrats pour la kinase AKT. Suivant le contexte cellulaire, elle est capable de réguler par phosphorylation de nombreuses classes moléculaires différentes comme des protéines, des lipides, des facteurs de transcriptions, des régulateurs du trafic vésiculaire, des enzymes métaboliques ou encore des régulateurs du cycle cellulaire. Cependant, il est reconnu que les substrats validés d'AKT ne sont pas forcément exclusif à AKT et peuvent être régulés par d'autres signaux cellulaires. *In*

*fine*, l'activation d'AKT favorise principalement la survie, la prolifération, la croissance cellulaire et le métabolisme du glucose (Manning and Cantley, 2007).

La kinase AKT régule l'activité de trois molécules majeures, la protéine GSK3, le facteur de transcription FOXO (*Forkhead Box O3*) et le complexe TSC1/TSC2 (*Tuberous Sclerosis*). GSK3 est généralement actif en l'absence de signaux exogènes. En phosphorylant ses substrats, il induit leurs inhibitions ou leurs dégradations (Kaidanovich-Beilin and Woodgett, 2011). AKT exerce ainsi une phosphorylation inhibitrice sur la protéine GSK3 et permet à plusieurs protéines impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire (MCL1, c-MYC) de réaliser leur fonction (Ding et al., 2007; Sears et al., 2000). Les facteurs de transcription FOXO contrôlent un ensemble de gènes qui sont impliqués dans l'adaptation au jeûne, au taux d'insuline faible et à la signalisation d'IGF1 (van der Vos and Coffey, 2011). L'activation de la signalisation PI3K/AKT conduit à une translocation des protéines FOXO hors du noyau et donc à l'atténuation de leur programme transcriptionnel. De cette façon, AKT inhibe l'expression des protéines BAD (*Bcl-Associated Death*), BIM et PUMA, impliquées dans l'induction de l'apoptose, des protéines p21 et p27, impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire et d'autres protéines impliquées dans l'inhibition de la croissance et les changements métaboliques (Webb and Brunet, 2014). Enfin, la kinase AKT stimule principalement le processus de biosynthèse sous-jacent à la croissance cellulaire en activant la kinase mTORC1. Le mécanisme principal d'activation se fait à travers la phosphorylation et l'inhibition du complexe 2 de la sclérose tubéreuse (TSC2), un inhibiteur puissant de mTORC1 (Inoki et al., 2002).





(Manning and Toker, 2017)

Figure 14 : Substrats et fonctions de la signalisation de la kinase AKT

### B.3 La protéine mTOR

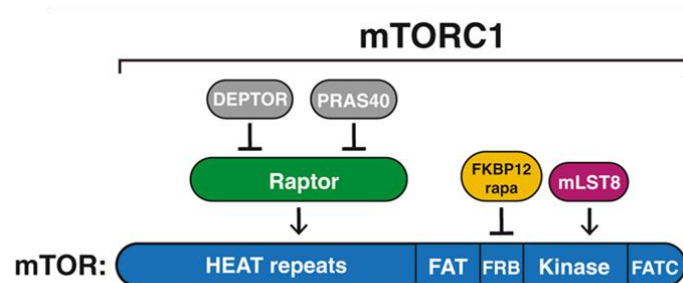
La protéine *mammalian Target Of Rapamycin* (mTOR) est une sérine/thréonine kinase intracellulaire de 289 kDa qui joue un rôle majeur dans le contrôle du cycle cellulaire, de la survie et dans l'organisation du cytosquelette. Cette protéine se compose d'une répétition en tandem de séquences HEAT dans sa section N terminale, impliquées dans les interactions protéines-protéines et suivi de deux domaines FAT (*Focal Adhesion Targeting*) qui vont permettre le maintien de la conformation optimale du site actif. A proximité de ce site se localise le domaine FRB (*FKBP12-Rapamycin Binding domain*) auquel vient se lier la protéine transporteuse de la rapamycine, la FKBP12 (Sabers et al., 1995). La protéine mTOR représente la sous-unité catalytique de deux complexes protéiques actifs, connus sous les noms de *mTOR Complex 1* (mTORC1) et *mTOR Complex 2* (mTORC2), qui remplissent des fonctions cellulaires différentes (Bhaskar and Hay, 2007).

#### B.3.1 Le complexe mTORC1 : structure et régulations

Le complexe mTORC1 est sensible à la rapamycine. Il est constitué des protéines mTOR, RAPTOR (*Regulatory Protein Associated with mTOR*) et mLST8 (*mammalian Lethal with Sec13 protein 8*). RAPTOR est la protéine majeure de ce complexe puisqu'elle participe à



sa stabilisation et assure le recrutement des substrats qui possèdent des domaines TOS (*TOR signaling Sequence*). Dans des conditions de privation en nutriments, RAPTOR se lie avec une haute affinité à mTOR, ce qui le maintient dans une conformation inactive, tandis qu'en milieu riche, cette interaction est moins forte, permettant ainsi à mTOR de phosphoryler ses cibles (Nojima et al., 2003). La protéine mLST8 interagit au niveau du domaine kinase de mTOR et assure la stabilité et la fonction de la boucle catalytique de la protéine (Yang et al., 2013b). De nombreux résultats suggèrent que ces 3 protéines sont essentielles puisque des souris *Knock-out* (KO) pour RAPTOR, mTOR ou mLST8 ne sont pas viables (Guertin et al., 2006). De plus, mTORC1 contient des sous-unités inhibitrices tels que les protéines PRAS40 (*Proline-Rich AKT substrate of 40 kDA*) et DEPTOR (*DEP domain containing mTOR interacting protein*).



(Saxton and Sabatini, 2017)

*Figure 15 : Structure du complexe mTORC1*

Le complexe mTORC1 est un senseur du statut énergétique, nutritionnel et métabolique de la cellule. Il peut être activé par les récepteurs membranaires aux facteurs de croissance ou par des signaux intracellulaires tels que le taux d'acides aminés ou d'ATP (Adénosine Triphosphate).

Dans la voie de signalisation induite par les facteurs de croissance comme l'*insulin Growth Factor* (IGF), la kinase AKT est capable de phosphoryler le complexe inhibiteur de mTOR, le complexe TSC1/TSC2. La protéine TSC2 est le GAP (*GTPase Activating Protein*) d'une petite protéine G, RHEB (*RAS Homolog Enriched in Brain*). Comme toutes les petites protéines G, RHEB existe sous deux formes, une forme désactivée, liée au GDP, et une forme activée liée au GTP. Ce dernier étant apporté et échangé contre le GDP par une protéine GEF (*G-protein Exchange protein*). RHEB-GTP est capable d'activer la protéine mTOR en se liant à elle au niveau de son domaine kinase. Cependant TSC2, grâce à son activité GTPasique, va précisément désamorcer RHEB. La protéine AKT activée peut phosphoryler TSC2 et inhiber

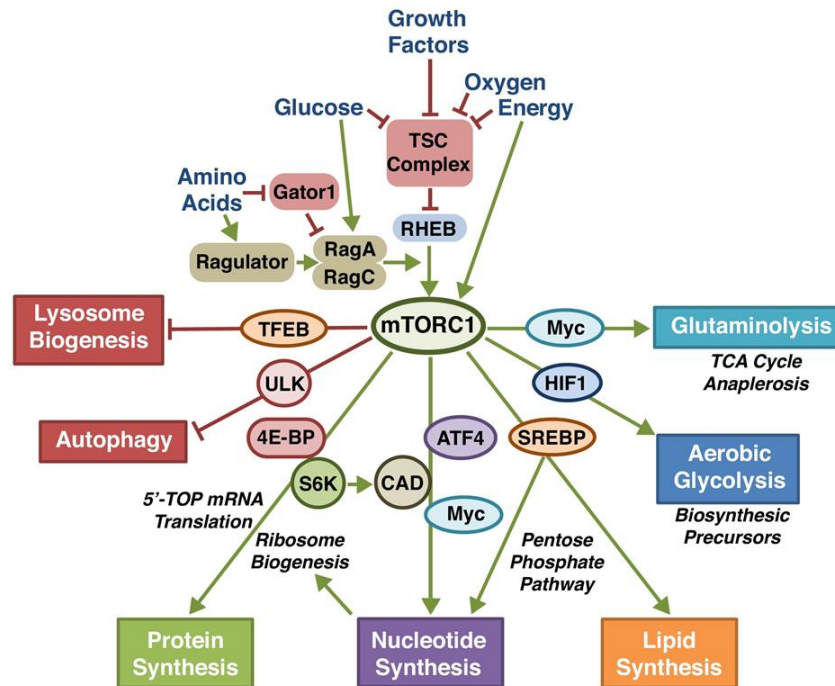
son activité GTPasique. L'hydrolyse de RHEB-GTP en RHEB-GDP n'a alors plus lieu et cela a pour conséquence l'activation de la protéine mTOR (Inoki et al., 2003). A noter que la kinase AKT peut activer indépendamment mTORC1 par la phosphorylation de la protéine inhibitrice PRAS40 qui entraîne sa dissociation de mTORC1 (Vander Haar et al., 2007).

Lorsque la cellule est en déficit énergétique, caractérisée par un ratio AMP/ATP élevé, l'*AMP Activated Protein Kinase* (AMPK) active TSC2 et inhibe RAPTOR par phosphorylation (Gwinn et al., 2008). Enfin, il a été rapporté qu'une diminution de la concentration en leucine dans la cellule peut induire une déphosphorylation des effecteurs de mTORC1 dont la *S6 Kinase 1* ou S6K1 (Teachey et al., 2009).

Afin de permettre à la cellule de croître et de se diviser, le complexe mTORC1 joue de nombreux rôles dont le contrôle de la synthèse de lipides, l'angiogenèse ou encore l'autophagie (Düvel et al., 2010; Li et al., 2007; Ramos et al., 2013). Cependant, son rôle majeur est de contrôler la synthèse protéique en phosphorylant des substrats impliqués dans la traduction d'ARN messagers particuliers. Les cibles d'aval les mieux caractérisées à ce jour sont la protéine kinase ribosomale p70S6K1 (ou S6K) et la protéine 4E-BP1 (*4E-Binding Protein 1*). Un très grand nombre de travaux sur l'activité de la rapamycine a utilisé le statut de phosphorylation de S6K, sur la thréonine 389 et de 4EBP1, sur les thréonines 37, 41 et 70, comme témoins de l'activité de mTOR.

À l'état basal, le complexe mTORC1 est associé à un facteur d'initiation de la traduction, EIF4E (*Eukaryotic translation Initiation Factor 4E*) par l'intermédiaire d'une protéine de répression, EIF4EBP1 (*EIF4E Binding Protein 1*). En absence de phosphorylation d'EIF4EBP1, le facteur EIF4E ne peut être libéré pour recruter les ribosomes chargés de démarrer le processus de traduction des ARN messagers en protéines. Mais lors de l'activation de mTOR, celle-ci peut phosphoryler EIF4EBP1, ce qui libère le facteur de traduction EIF4E, qui peut alors exercer ses effets sur la synthèse des protéines (Gingras et al., 2001).

Un autre substrat de mTORC1 est la protéine p70S6K, ou S6K1, que mTOR phosphoryle sur le résidu Ser389, et qui est une des kinases réalisant la phosphorylation de la protéine S6 des ribosomes (S6RP). L'activation de mTOR a ainsi pour conséquence l'activation de protéines indispensables à la structure des ribosomes et par conséquent à la traduction des messagers en protéines (Holz et al., 2005). Par ailleurs, la S6 kinase a parmi de nombreux substrats, un facteur activant l'élongation de la chaîne polypeptidique en cours de synthèse, EEF2 (*Eukaryotic translation Elongation Factor 2*).

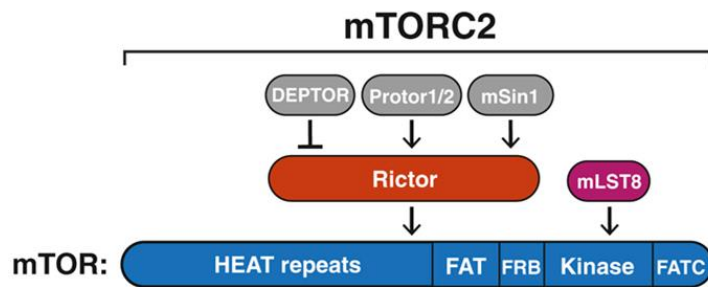


(Ben-Sahra and Manning, 2017)

*Figure 16 : Régulations et fonctions du complexe mTORC1*

### B.3.2 Le complexe mTORC2 : structure et régulations

Alors que le complexe rapamycine/FKBP12 inhibe directement mTORC1, mTORC2 est caractérisé par son insensibilité à la rapamycine et ses analogues. Il est constitué des protéines mTOR, RICTOR (*Rapamycin Insensitive Companion of mTOR*) et aussi mLST8. Les rôles de la protéine RICTOR sont très peu connus mais elle aurait un rôle analogue à RAPTOR du complexe mTORC1 (Jacinto et al., 2004). mTORC2 contiendrait également DEPTOR (Peterson et al., 2009) et les sous-unités régulatrices PROTOR1/2 et SIN1 qui serait fondamentales pour le recrutement du complexe au niveau de la membrane plasmique et permettre l'activation de la protéine AKT (Liu et al., 2015).



(Saxton and Sabatini, 2017)

*Figure 17 : Structure du complexe mTORC2*

L'activité de la protéine kinase mTORC2 est stimulée par les facteurs de croissance de manière dépendante de PI3K (Huang et al., 2008). En effet, le domaine PH de la sous-unité régulatrice SIN1 inhibe l'activité catalytique de mTORC2 en l'absence d'insuline mais cette inhibition est levée lors de la liaison au PIP<sub>3</sub> (Liu et al., 2015). Une autre étude a révélé que la kinase PI3K favorise l'association de mTORC2 avec des ribosomes pour induire son activité kinase mais les mécanismes de cette interaction ne sont pas clairs (Zinzalla et al., 2011). De manière inattendue, la signalisation du complexe est également régulée par mTORC1 en raison de la présence d'une boucle de rétrocontrôle négatif qui sera détaillée ci-après.

Le rôle biologique du complexe mTORC2 n'est pas aussi bien connu que celui de mTORC1. Alors que mTORC1 régule la croissance cellulaire et le métabolisme, mTORC2 contrôle plutôt la prolifération et la survie cellulaire en phosphorylant plusieurs membres de la famille des protéines kinases AGC. Le premier substrat à avoir été identifié était la PKC $\alpha$ , un régulateur du cytosquelette d'actine (Jacinto et al., 2004). Plus récemment, des études ont révélé que mTORC2 peut être capable de phosphoryler d'autres membres de la famille des PKC dont les PKC $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  et  $\zeta$  qui régissent tous les aspects du remodelage cytosquelettique et de la migration cellulaire (Gan et al., 2012; Li and Gao, 2014; Thomanetz et al., 2013). mTORC2 phosphoryle et active également SGK1 (*Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1*), une autre kinase de la famille AGC, qui régule le transport ionique ainsi que la survie cellulaire (García-Martínez and Alessi, 2008). Cependant, le rôle le plus important de mTORC2 réside dans la phosphorylation et l'activation de la protéine AKT. Même si la phosphorylation dépendante de mTORC2 est nécessaire pour que AKT phosphoryle certains substrats comme le facteur de transcription FOXO, elle ne l'est pas pour la phosphorylation d'autres substrats comme GSK3, TSC2 ou mTORC1 (Jacinto et al., 2006).

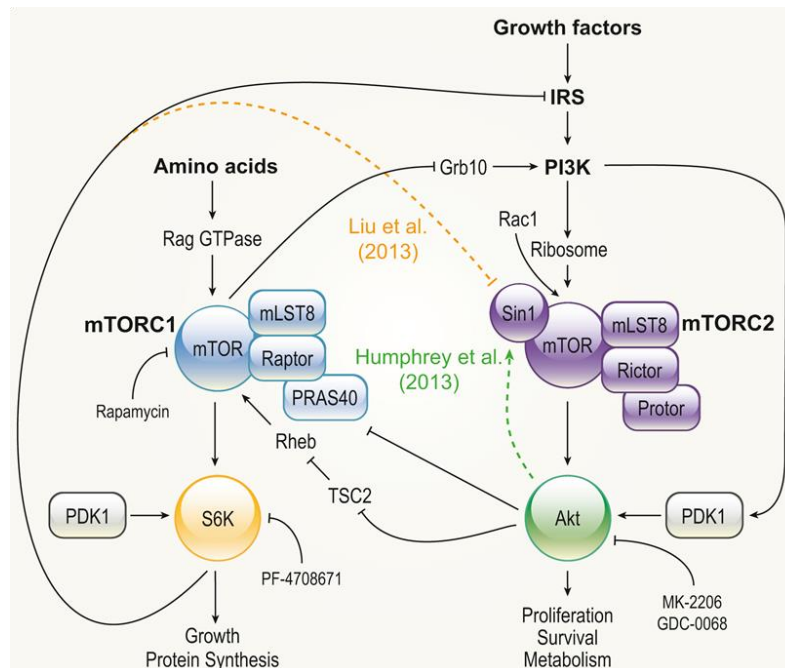
## C. Les régulations de la voie de signalisation PI3K/mTOR

### C.1 Les boucles de rétrocontrôle

Les boucles de rétrocontrôle permettent une régulation plus fine de l'activation de la voie PI3K/mTOR. Ces boucles ajoutent un niveau supplémentaire de complexité et sont souvent à l'origine des échecs des traitements ciblant cette voie. La connaissance de ces boucles est donc essentielle afin d'anticiper les effets des inhibiteurs d'une des kinases de la voie.

Les régulations les plus souvent décrites dans la littérature sont des boucles de rétrocontrôle négatif exercées par mTORC1 ou par son substrat, la p70S6K, sur les éléments en aval des récepteurs tyrosines kinases, réduisant ainsi l'activité de la voie de signalisation. Il a été montré que mTORC1, par le biais de la phosphorylation de la protéine GRB10 (*Growth factor Receptor-Bound protein 10*), inhibe le récepteur IGF1R empêchant ainsi le recrutement de la PI3K par IRS1 (Dey et al., 1996). IRS1 peut aussi être régulée négativement par le complexe mTORC2 qui va stabiliser par phosphorylation l'ubiquitine ligase FBW8 (*FBox and WD repeat domain containing 8*), favorisant sa dégradation (Kim et al., 2012). Il a également été montré que p70S6K peut inhiber par phosphorylation la sous-unité régulatrice de mTORC2, SIN1, et réduire ainsi l'activité du complexe et donc l'activation de la protéine AKT (Liu et al., 2013).

Moins souvent décrits, il existe également des rétrocontrôles positifs permettant d'amplifier la signalisation de la voie PI3K/mTOR. Le recrutement de la protéine GAB1 aux récepteurs tyrosines kinases grâce à son domaine SH2 va permettre d'amplifier le recrutement et l'activation de la kinase PI3K et augmenter la production de PIP<sub>3</sub> à la membrane plasmique générant un rétrocontrôle positif (Kiyatkin et al., 2006). Il a été montré aussi que l'activation d'AKT peut stimuler une E3 ubiquitine ligase, la MKRN1 (*Makorin Ring actor protein 1*), qui a pour rôle d'ubiquitinyler et dégrader la phosphatase PTEN, régulateur négatif de la PI3K (Lee et al., 2015b). Très récemment, il a été mis en évidence une nouvelle boucle de régulation positive de l'activité d'AKT. Il s'avère que la protéine SIN1, et son résidu Thr86, est un substrat physiologique de la kinase AKT. Cette dernière, partiellement activée suite à la phosphorylation de son résidu Thr308 par PDK1, serait capable de phosphoryler SIN1 induisant l'activation du complexe mTORC2 qui, en retour, activera complètement AKT en phosphorylant son résidu Ser473 (Yang et al., 2015).



(Yang et al., 2015)

Figure 18 : Les boucles de rétrocontrôle de la voie PI3K/mTOR

## C.2 La voie de signalisation RAS/MAPK

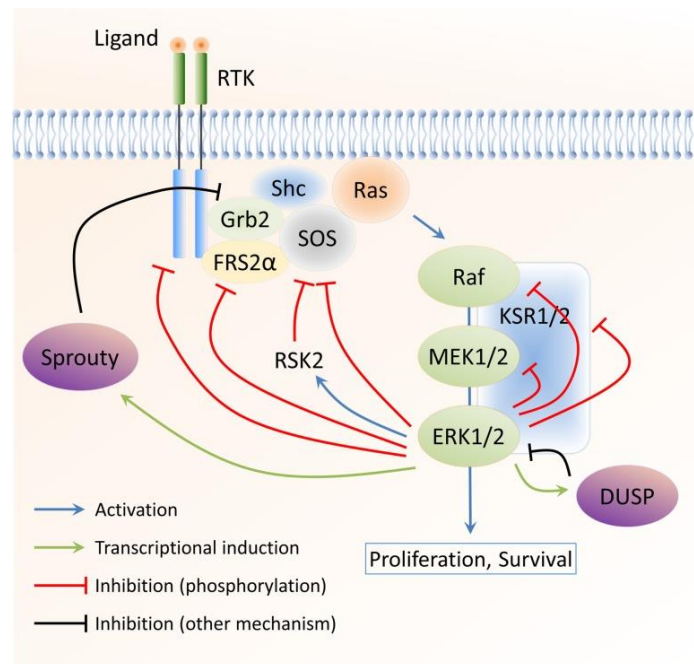
L'autre grande voie de signalisation intracellulaire pouvant être activée par les récepteurs tyrosines kinases est la voie des RAS/MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*). Cette cascade de signalisation, à l'image de la voie PI3K/mTOR, régule de nombreuses voies intracellulaires comme la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. Une activation constitutive de cette voie conduira à une croissance et à une survie cellulaire incontrôlées favorisant le développement d'un processus tumoral (Schubbert et al., 2007). En plus d'être activées par les mêmes récepteurs, les voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/mTOR possèdent des liens très étroits. D'une part, elles agissent souvent sur les mêmes substrats à l'image des régulations sur les facteurs de transcription FOXO et c-MYC ou encore les protéines BAD et GSK3 et d'autre part, les interconnexions entre leurs différents effecteurs sont nombreuses. Ainsi, ce réseau complexe peut faciliter le développement de résistance acquise aux médicaments puisque l'inhibition d'une voie entraîne généralement l'activation compensatrice de l'autre (Carracedo et al., 2008).

### C.2.1 Les kinases effectrices de la voie RAS/MAPK

Après stimulation par un facteur de croissance, le récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase recrute des protéines adaptatrices comme GRB2 (*Growth factor-Bound 2*) qui vont permettre de recruter à leur tour des protéines GEF comme SOS (*Son Of Sevenless homolog*). Ces dernières vont activer RAS, la première kinase effectrice de la voie de signalisation. Les protéines RAS sont de petites protéines G qui possèdent une activité GTPase intrinsèque faible et qui fonctionnent comme un « interrupteur » GDP (*Guanosine Diphosphate*) / GTP (*Guanosine Triphosphate*). La forme liée au GTP est active. Les GEF vont permettre l'échange du GDP en GTP tandis que d'autres protéines, les GAP vont stimuler l'activité GTPasique de RAS, transformant le GTP en GDP. Dans sa forme active, RAS va cibler notamment des sérines thréonines kinases connues sous le nom de RAF. Ces kinases vont phosphoryler de multiples cibles dont les kinases MEK1 (*Mitogen-activated Extracellular-signal-regulated Kinases 1*) et MEK2. Ces dernières ont une double activité tyrosine et sérine/thréonine kinase qui vont activer à leur tour leurs cibles ERK1 (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) et ERK2. Ce sont des sérines thréonines kinases qui vont activer par phosphorylation une variété de substrats comme des kinases, des phosphatases, des protéines du cytosquelette et des facteurs de croissance impliqués dans l'angiogenèse (Katz et al., 2007). De plus, elles peuvent être transloquées rapidement dans le noyau et activer des facteurs de transcription comme TCF (*Ternary Complex Factor*) qui jouent un rôle majeur dans l'expression des gènes IEG (*Immediate Early Gene*) dont *c-FOS* et *c-MYC* impliqués dans la survie, la division et la motilité cellulaire (Pintus et al., 2002).

De multiples boucles de rétrocontrôle participent à la dynamique de la voie de signalisation RAS/MAPK. Les régulations les plus souvent décrites dans la littérature sont des boucles de rétrocontrôle négatif exercées par ERK afin de moduler l'intensité et la durée de l'activation de la voie. Il a été montré que ERK désactive directement RAF et MEK (Ramos, 2008). Elle est capable d'hyper-phosphoryler RAF afin de favoriser sa déphosphorylation par des phosphatases et diminuer son activité. ERK exerce un autre rétrocontrôle négatif en favorisant l'expression et l'activité des phosphatases DUSP1 (*Dual Specificity Phosphatase 1*), DUSP5 et DUSP6 qui seront capables de déphosphoryler, en retour, les résidus thréonine et tyrosine de ERK (Fritsche-Guenther et al., 2011). Enfin il a été montré un rétrocontrôle négatif supplémentaire de ERK qui est capable d'interférer avec l'activation de RAS par son recrutement par des protéines adaptatrices ou son activation par les GEF. En effet, la

phosphorylation de la protéine SOS par ERK induit sa dissociation avec la protéine GRB2 et en conséquence, empêche le recrutement de RAS (Shin et al., 2010).



(Lake et al., 2016)

*Figure 19 : Les boucles de rétrocontrôle négatif de la voie RAS/MAPK*

A ce jour, deux boucles de régulations positives ont été rapportées. D'une part, la kinase ERK peut phosphoryler RAF sur différents sites pour augmenter son activité d'un facteur 4 (Ramos, 2008). D'autre part, elle est capable de phosphoryler DUSP1, DUSP5 et DUSP6 sur certains résidus afin d'accélérer leur dégradation par le protéasome et en conséquence, d'empêcher son inactivation (Zeliadt et al., 2008).

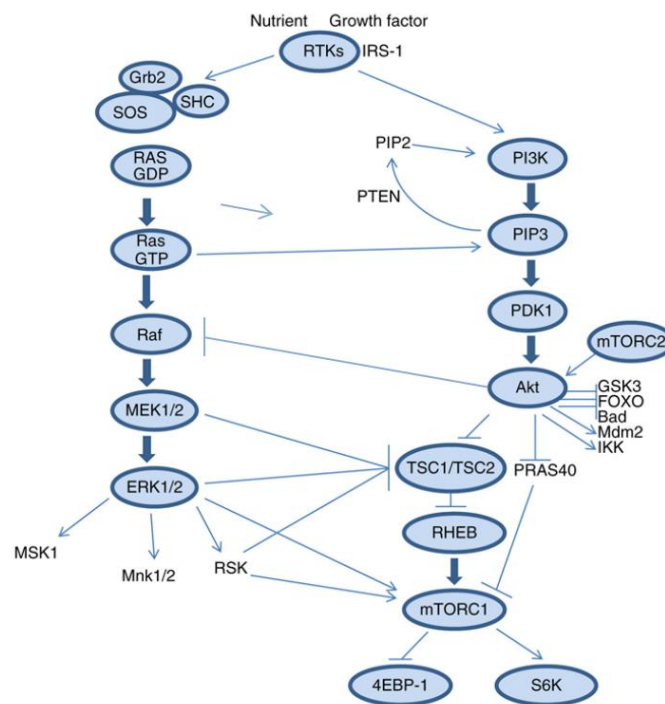
### C.2.2 Les interconnexions avec la voie PI3K/mTOR

Les voies PI3K/mTOR et RAS/MAPK forment un réseau biochimique d'interactions au sein duquel les mécanismes d'interaction varient selon le type cellulaire et le contexte. Ces interactions viennent complexifier les dynamiques de signalisation qui sont déjà influencées par les boucles de rétrocontrôle de chacune des voies. Par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des voies, il a été mis en évidence plusieurs niveaux de régulation dont des régulations négatives. Par exemple, la kinase ERK peut phosphoryler plusieurs résidus de GAB1 qui va empêcher la protéine de recruter la PI3K au niveau de la membrane plasmique et donc abroger l'initiation de la voie (Zhang et al., 2002). De manière identique, AKT est capable d'inhiber par



phosphorylation du résidu Ser259, la protéine RAF empêchant son recrutement à la membrane (Zimmermann and Moelling, 1999). Comme GSK3 peut inhiber PTEN en phosphorylant ses résidus Ser362 et Thr366, il a été également montré que son inhibition par ERK induit une augmentation de l'activité de PTEN ce qui permet de diminuer la formation de PIP3 et l'activation de la voie PI3K/mTOR (Al-Khoury et al., 2005).

Cependant, la kinase ERK peut également favoriser l'activation de la voie PI3K/mTOR notamment en inhibant TSC2 directement par phosphorylation ou indirectement par l'inhibition de GSK3 qui est un activateur de TSC2 (Roux et al., 2004). Par ailleurs, ERK favorise l'activité de mTORC1 en phosphorylant sa sous-unité RAPTOR (Carriere et al., 2011). Des études ont aussi révélé des interactions activatrices de la voie RAS/MAPK par la voie PI3K/mTOR. Ainsi, le recrutement de GAP à la membrane plasmique par la PI3K activée permet de recruter le complexe GRB2/SOS qui amplifie l'activation de RAS. L'activateur d'AKT, PDK1 est capable d'activer MEK en phosphorylant ses résidus Ser222 et Ser226 (Saini et al., 2013). Enfin, il a été montré que PDK1 et mTORC2 régulent de façon positive les PKC qui peuvent activer différents niveaux de la voie RAS/MAPK comme RAF, MEK1 et ERK1 (Pearce et al., 2010).



(Kim and Eng, 2012)

*Figure 20 : La voie RAS/MAPK et ses interactions avec la voie PI3K/mTOR*

## Chapitre 4 - La voie PI3K/mTOR comme cible thérapeutique

### A. Les inhibiteurs de première génération

Les protéines PI3K et mTOR sont des acteurs majeurs de la signalisation cellulaire et agissent comme intégrateurs de signaux multiples, y compris les signaux oncogéniques. En effet, la voie PI3K/mTOR est l'une des voies de signalisation les plus fréquemment activées dans le cancer humain (Millis et al., 2016). Les altérations les plus fréquentes se rencontrent au niveau de la PI3K avec des amplifications ou des mutations activatrices sur un petit nombre de sites précis de la sous-unité catalytique p110, au niveau de PTEN avec des délétions ou des méthylations au niveau du promoteur du gène mais aussi, de manière moins fréquente, au niveau d'AKT ou de mTOR. De ce fait, la voie PI3K/mTOR représente une cible très importante pour le développement innovant de médicaments anticancéreux (Rodon et al., 2013). Aujourd'hui, plus d'une cinquantaine de composés inhibant la voie de signalisation est en développement et de nombreux essais cliniques sont en cours.

#### A.1 Les inhibiteurs de PI3K

La première génération d'inhibiteurs de PI3K est constituée de la wortmannine et du LY294002. Ce sont des inhibiteurs qui se lient de manière irréversible à la protéine PI3K par fixation covalente sur un résidu lysine nécessaire à l'activité de l'enzyme (Walker et al., 2000). Le LY294002 est environ 500 fois moins puissant que la wortmannine. Ces deux composés ont démontré une activité antitumorale mais leur développement a été limité du fait d'une faible solubilité et stabilité et d'une toxicité importante notamment au niveau de la peau et du foie (Bauer et al., 2015). Cependant, ces inhibiteurs sont encore utilisés en recherche préclinique pour étudier les signaux de transduction qui impliquent la kinase PI3K.

Par la suite, une meilleure compréhension de la voie de signalisation et la connaissance des différentes isoformes de PI3K ont conduit au développement d'inhibiteurs pan-PI3K de classe I (inhibiteur des isoformes p110 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ ) dit de seconde génération connus pour agir sur le site catalytique de la kinase.

#### A.2 Les inhibiteurs de mTOR

La rapamycine (ou sirolimus) a été découverte il y a une trentaine d'année sur l'île de Rapa Nui (île de Pâques). Elle constitue le premier inhibiteur de mTOR mis sur le marché. La

rapamycine a d'abord été étudiée comme antifongique mais aussi comme immunosuppresseur par son action inhibitrice sur la prolifération des lymphocytes T induite notamment par l'interleukine 2 (Nungaray et al., 2005). L'EMA, l'agence européenne des médicaments, a autorisé son utilisation (commercialisé sous le nom de Rapamune®) dans la prévention du rejet des greffes rénales. Cependant, la rapamycine n'a pas d'indication en cancérologie. Des dérivés de la rapamycine, nommés « rapalogues » ont été développés par addition de groupe ester, éther ou phosphonate afin d'augmenter la solubilité et la biodisponibilité et de diminuer les effets immunosuppresseurs. Parmi ces dérivés se trouvent le temsirolimus (CCL779) et l'évérolimus (RAD001), deux médicaments qui ont reçu leur autorisation de mise sur le marché en 2007 et 2009 respectivement, pour le traitement du cancer du rein et du sein ou encore dans les lymphomes. Ces rapalogues forment un complexe tri-moléculaire de forte affinité avec la protéine FKBP12 qui se fixe au domaine FRB, créant ainsi un encombrement stérique empêchant mTOR de former un complexe protéique fonctionnel (Klümper et al., 2010).

Les rapalogues sont bien tolérés par les patients, leurs effets toxiques principaux se manifestant par des réactions cutanées, une diarrhée, une hyperglycémie et une fatigue importante. Aussi, de par leur effet immunosuppresseur, ils augmentent le risque d'infections intercurrentes.

Un certain nombre de mécanismes de résistance aux inhibiteurs de mTOR de première génération ont été mis en évidence au travers de plusieurs études et essais cliniques. Il a été répertorié notamment l'existence de mutations au niveau du domaine FRB ou de FKBP12 dans des modèles de lymphome ou encore une levée de plusieurs boucles de rétrocontrôle qui vont entraîner une augmentation de l'activité de mTORC2 et/ou une activation de la voie RAS/MAPK dans différents cancers (Carracedo et al., 2008; Lorenz and Heitman, 1995; Sarbassov et al., 2005). Il a été également rapporté une augmentation de la production d'IGF1 ou une diminution d'expression de molécules pro-apoptotiques comme Bcl-2 suite à l'utilisation des rapalogues (Majumder et al., 2004; Raymond et al., 2004). L'ensemble de ces limites a conduit au développement de nouvelles molécules plus spécifiques que les rapalogues.

<b>Inhibiteurs</b>	<b>Phase d'étude</b>	<b>Cancer</b>
Rapamycine	I / II	Tumeurs solides avancées Rectum Gliome Vessie
Temsirolimus	I / II / III	Rein Thyroïde Poumon Lymphome Tête et cou Tumeurs solides avancées
Ridaforolimus	I / II	Sein Tumeurs solides avancées
Évérolimus	I / II / III / IV	Vessie Sein Sarcome Rein Foie Thyroïde Gliome Tête et cou Tumeurs solides avancées Lymphome Colon Prostate

*Tableau 5 : Les inhibiteurs de première génération de mTOR en essai clinique*  
(<https://clinicaltrials.gov>, octobre 2017 – ouvert aux inclusions)

## B. Les inhibiteurs de seconde génération

### B.1 Les inhibiteurs de PI3K

Le développement des inhibiteurs de PI3K de première génération a conduit à l'élaboration d'inhibiteurs de seconde génération. Cette génération comprend deux classes d'inhibiteurs compétitifs de l'ATP, les inhibiteurs pan-PI3K de classe I qui ciblent toutes les sous unités catalytiques de la p110 et les inhibiteurs de PI3K de classe I sélectifs d'une isoforme.

Il existe actuellement de nombreux inhibiteurs pan-PI3K en évaluation clinique tels que les molécules XL-147 (Shapiro et al., 2014), GDC-0941 (Sarker et al., 2015) et le BKM120 (Ragon et al., 2017). Le BKM120 (ou buparlisib) est un inhibiteur compétitif de l'ATP qui inactive toute les isoformes avec la même efficacité et présente une activité en présence ou non de mutation de la PI3K (Maira et al., 2012).

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'une isoforme de la sous-unité catalytique de la p110 des PI3Ks de classe I présente un intérêt selon le contexte cellulaire, en limitant les toxicités liées à l'inhibition totale de la PI3K. Par exemple, la p110 $\alpha$  est essentielle pour la signalisation et la croissance de tumeurs portant des mutations activatrices du gène *PI3KCA* (gène spécifique de la p110 $\alpha$ ). Le BYL-719 (alpelisib), spécifique de la p110 $\alpha$ , a été le premier inhibiteur spécifique d'une isoforme testé chez l'homme. Dans un essai de phase I pour ce composé, des rémissions partielles ont été observées pour 7 patients sur 39 ayant des tumeurs solides (Gonzalez-Angulo et al., 2013). Les tumeurs PTEN-déficientes sont, elles, dépendantes de la p110 $\beta$ . Un composé spécifique de cette sous-unité, le GSK2636771, a révélé un bénéfice thérapeutique dans un essai de phase I (Mateo et al., 2017). Enfin, la p110 $\delta$  est majoritairement exprimée dans les lignées lymphocytaires ce qui en fait une cible intéressante pour le traitement des cancers hématologiques. Son inhibiteur spécifique CAL-101 (idelalisib) a été le premier à avoir été approuvé pour une utilisation clinique dans les lymphomes (Gopal et al., 2014).

Jusqu'à aujourd'hui, le succès des inhibiteurs pan-PI3K de classe I en monothérapie se révèle modeste. En effet, à en juger par les différentes observations cliniques, il a été suggéré que les composés auraient plus un effet cytostatique que cytotoxique. Néanmoins, des réponses partielles et des stabilisations ont été observées dans de nombreux cancers dont celui du sein, du poumon ou encore de la prostate. L'efficacité limitée de ces inhibiteurs pourrait résulter de la levée des rétrocontrôles négatifs sur la signalisation par les récepteurs des facteurs de croissance ou encore de l'utilisation de doses subtoxiques trop faibles pour inhiber efficacement la kinase PI3K.

Classe d'inhibiteurs	Inhibiteurs	Phase d'étude	Cancer
pan-PI3K de classe I	NVP-BKM120	I / II	Carcinome Lymphome Mélanome Tête et cou
	XL-147	I	Tumeurs solides avancées
isoforme spécifique p110 $\alpha$	BYL-719	I / II	Sein Rectum Tête et cou
	GDC-0032	I / II	Sein Tumeurs solides avancées Lymphome Poumon
isoforme spécifique p110 $\beta$	GSK2636771	I	Mélanome Estomac Tumeurs solides avancées
isoforme spécifique p110 $\delta$	CAL-101	I / II / III / IV	Poumon Lymphome Leucémie
	AMG319	II	Carcinome

*Tableau 6 : Les inhibiteurs de PI3K en essai clinique*  
(<https://clinicaltrials.gov>, octobre 2017 – ouvert aux inclusions)

## B.2 Les inhibiteurs d'AKT

Akt joue un rôle central dans la voie de transduction du signal et son hyperactivation est présente dans de nombreuses tumeurs. Ceci a conduit au développement d'inhibiteurs d'AKT. Il existe trois classes différentes d'inhibiteurs, les inhibiteurs compétitifs de l'ATP, les inhibiteurs allostériques et les inhibiteurs de la liaison PIP3.

Classe d'inhibiteurs	Inhibiteurs	Phase d'étude	Cancer
AKT (allostérique)	MK-2206	I / II	Carcinome Sein
AKT (ATP-compétitif)	GDC-0068	I / II	Sein Estomac Prostate
	GSK2141795	I / II	Mélanome Sein Leucémie
AKT (liaison PIP <sub>3</sub> )	KRX-0401	II	Gliome

*Tableau 7 : Les inhibiteurs d'AKT en essai clinique*  
(<https://clinicaltrials.gov>, octobre 2017 – ouvert aux inclusions)

Le premier inhibiteur d'AKT qui est entré en développement clinique est la molécule KRX-0401 connue sous le nom de perifosine. Ce composé est un alkylphospholipide qui a la particularité de s'accumuler au niveau de la membrane plasmique et d'empêcher la liaison de la protéine AKT au PIP<sub>3</sub>. Utilisé en monothérapie, il a montré un effet antitumoral modeste associé à un effet anti-angiogénique. Plusieurs essais cliniques sur des patients atteints de gliome sont en cours pour évaluer l'effet d'une combinaison avec des chimiothérapies standards (Brown and Banerji, 2017).

Les inhibiteurs compétitifs de l'ATP permettent d'inhiber l'activité du site catalytique d'AKT c'est-à-dire la phosphorylation de ses substrats dont la kinase mTOR. Parmi les nouvelles molécules développées en clinique, le GDC-0068 et le GSK2141795 ont montré des activités antitumorales, antiprolifératives mais non cytotoxiques dans différentes études précliniques (Cheraghchi-Bashi et al., 2015; Saura et al., 2017). Cependant, la limite majeure de ces inhibiteurs est leur manque de sélectivité. En effet, les isoformes d'AKT présentent de nombreuses homologies avec les autres membres de la famille AGC dont les PKA, PKC et p70S6K (Hers et al., 2011).

Alors, d'autres molécules comme le MK-2206 ont été développées afin de se fixer sur le domaine PH spécifique de la kinase AKT et permettre un changement conformationnel de la

protéine pour bloquer la translocation membranaire de la protéine AKT (Hirai et al., 2010). Ainsi, le MK-2206 est un inhibiteur allostérique hautement sélectif des trois isoformes d'AKT. Ce composé présente une sensibilité plus importante dans des lignées PTEN-déficientes ou ayant une mutation du gène *PI3KCA*. Dans un essai de phase I sur des patients atteints de tumeurs solides avancées, MK-2206 était capable de diminuer l'activité d'AKT, de PRAS40 et de GSK3 dans les cellules tumorales avec un profil de tolérance acceptable (Yap et al., 2011). Dans des modèles de cancer du sein, ce composé induit l'apoptose de manière dose-dépendante, inhibe la progression du cycle cellulaire et est utilisé en combinaison avec des thérapies ciblées (Sangai et al., 2012).

### **B.3 Les inhibiteurs à double cible**

Le développement d'inhibiteurs permettant un blocage à deux niveaux de la voie PI3K/mTOR est en plein essor à l'heure actuelle. L'intérêt de ces petites molécules est d'améliorer l'efficacité des traitements actuels en s'abstenant de l'effet des boucles de rétrocontrôles internes à la voie PI3K/mTOR. Il existe par exemple aujourd'hui des inhibiteurs ciblant simultanément mTORC1 et mTORC2 et des inhibiteurs ciblant les protéines PI3K et mTOR.

Les inhibiteurs de mTORC1 et mTORC2 ciblent le site de liaison à l'ATP au niveau du site catalytique de l'enzyme. Théoriquement, le principal avantage attendu est une diminution de la phosphorylation d'AKT en bloquant mTORC2 et une meilleure inhibition de mTORC1. Parmi ces inhibiteurs, les composés INK128 et AZD2014 sont en développement clinique dans plusieurs types de cancer. Les résultats précliniques ont montré que ces composés ont une plus grande efficacité que les rapalogues et inhibent la croissance de plusieurs types de lignées cellulaires cancéreuses à la fois *in vitro* et *in vivo* (Pike et al., 2013; Vilar et al., 2011).



<b>Classe d'inhibiteurs</b>	<b>Inhibiteurs</b>	<b>Phase d'étude</b>	<b>Cancer</b>
mTORC1 - mTORC2	INK128	I / II	Thyroïde Sein Tumeurs solides avancées Poumon Foie Gliome Rein Sarcome Lymphome
	AZD2014	I / II / III	Sein Poumon Prostate Carcinome Rein Estomac Gliome
PI3K - mTOR	GDC-0980	I / II	Prostate
	PF-05212384	I / II	Sein Tumeurs solides avancées Poumon Tête et cou Pancréas
	PQR309	I / II	Sein Lymphome

*Tableau 8 : Les inhibiteurs doubles cibles en essai clinique*  
(<https://clinicaltrials.gov>, octobre 2017 – ouvert aux inclusions)

De par l'analogie structurale entre mTOR et PI3K, certains inhibiteurs sont capables d'inhiber à la fois les protéines PI3K et mTOR (mTORC1 et mTORC2). L'avantage de ce type d'inhibiteur est de s'affranchir de l'activation de PI3K suite à la levée de la boucle de rétrocontrôle négatif S6K-IRS1-PI3K lors d'un traitement par un inhibiteur de mTOR de première génération. Plusieurs composés sont en cours d'essais clinique de phase I ou II tels que le GDC-0980, le PF-05212384 et le PQR309. Le XL765 a été le premier inhibiteur à double cible utilisé dans les tumeurs solides incluant le cancer du sein (Papadopoulos et al., 2015). Le GDC-0980 est un inhibiteur oral qui présente une activité préclinique dans de nombreux modèles tumoraux. Dans des études de phase I, son activité a été démontrée au niveau de cellules tumorales porteuses de mutations de PI3K, PTEN ou RAS (Martin et al., 2013). Un autre composé, le BEZ235 (ou dactolisib), a été développé en modifiant la structure d'un inhibiteur de PDK1. Ce composé peut inhiber simultanément la protéine PI3K et mTOR à de très faibles concentrations (Maira et al., 2008). Il a été montré que ce composé possède une puissante activité antitumorale dans des modèles de xénogreffes de tumeurs humaines (Foley et al., 2017; Li et al., 2015; Stauffer et al., 2007; Zhu et al., 2015a). Par ailleurs, il semblerait que le BEZ235 soit plus efficace dans les cellules tumorales présentant une forte activation de la voie PI3K/mTOR. Le BEZ235 a fait l'objet de nombreux essais cliniques de phase I et II dans lesquels une activité antitumorale a été mise en évidence. Cependant, son développement a été arrêté en raison de propriétés pharmacocinétiques défavorables (Massard et al., 2017; Seront et al., 2016).

### **C. La résistance aux inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR**

Au cours des dernières décennies, de nombreuses molécules ont été développées pour cibler spécifiquement les voies de signalisation oncogénique dont la voie PI3K/mTOR. Cependant, les médicaments ciblant cette voie de signalisation n'ont pas eu le succès escompté. Comme cela est observé avec d'autres thérapies ciblées, tous les patients traités avec un inhibiteur de la voie PI3K/mTOR vont développer une résistance secondaire. Des nouvelles stratégies thérapeutiques évaluant des combinaisons de traitements sont donc nécessaires pour que le ciblage de la voie PI3K/mTOR se traduise par un bénéfice clinique prolongé.

On distingue habituellement deux types de résistances, la résistance primaire et la résistance secondaire ou acquise. Une tumeur présentant une résistance primaire ne présente aucune réponse clinique à une thérapie alors qu'une tumeur présentant une résistance secondaire ne va plus répondre au traitement de façon tardive, après une réponse clinique de

plusieurs mois généralement. La résistance secondaire est définie comme la rechute à un médicament.

### **C.1 Les boucles de rétrocontrôle et les altérations génomiques**

Comme évoqué précédemment, les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de la voie de signalisation PI3K/mTOR les plus largement décrits dans plusieurs modèles de cancers humains concernent la perte de boucles de rétrocontrôle négatif et la présence d'altérations génomiques. En effet, l'utilisation d'inhibiteur de PI3K, de la kinase AKT ou encore de mTOR lèvent les boucles de rétrocontrôle dans laquelle S6K1 inhibe IRS1, une des molécules qui permet le recrutement de la PI3K à la membrane plasmique, et dans laquelle AKT inhibe l'activité de la protéine RAF de la voie RAS/MPAK (Courtney et al., 2010).

De nombreuses altérations génomiques entraînant une résistance aux inhibiteurs ont été également rapportées à travers plusieurs études. Par exemple, des mutations de la phosphatase PP2A ou dans le domaine FRB de la protéine mTOR confèrent aux cellules une résistance aux rapalogues (Dumont et al., 1995; Tsukamoto et al., 2014). Il a été décrit dans un modèle de carcinome à cellules rénales qu'une mutation activatrice du gène codant pour la p110 $\beta$  (*PI3KCB*) confère aux cellules une résistance aux inhibiteurs de PI3K ce qui suggère un rôle oncogénique du gène *PI3KCB* (Nakanishi et al., 2016). Une résistance aux inhibiteurs de PI3K et d'AKT a également été rapportée dans un modèle de cancer du sein caractérisé soit par une amplification du gène *PI3KCA*, soit par une perte fonctionnelle du gène suppresseur de tumeur *PTEN* (Huw et al., 2013; Juric et al., 2015; Le et al., 2016).

### **C.2 Les pompes d'efflux**

Le mécanisme de résistance consistant à repousser un médicament de la cellule a été mis en évidence pour la première fois dans des cellules leucémiques devenues résistantes aux anthracyclines (Inaba et al., 1979). L'efflux consiste en un mécanisme très général participant à l'homéostasie cellulaire en expulsant les agents néfastes (Paulsen et al., 1997). Des transporteurs vont reconnaître de façon primaire des substrats physiologiques tels que des nutriments ou des produits de catabolisme, et leur activité de transport des médicaments va être donc le plus souvent opportuniste. La surexpression de ces transporteurs est un des mécanismes les plus courants contribuant au développement d'une résistance multidrogue (MDR).

Les cellules cancéreuses développent souvent une MDR après un traitement chronique avec des agents classiques utilisés en chimiothérapie (Lynch et al., 2004). Ces cellules

acquièrent alors la capacité de résister à de nombreux médicaments non apparentés structurellement et mécaniquement, ce qui entraîne fréquemment un échec dans la chimiothérapie et la rechute du patient (Wu et al., 2011). La surexpression de deux protéines, MDR1 (*Multidrug Resistance protein 1*) et BCRP1 (*Breast Cancer Resistance Protein 1*), a été mise en évidence lors de l'apparition de résistances aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans de nombreux modèles de cancer (Szakács et al., 2006). Dans des études sur le glioblastome, il a été montré que les inhibiteurs de seconde génération de la voie PI3K/mTOR sont des substrats de ces deux protéines et que cela a pour conséquence de limiter la pénétration des médicaments dans le cerveau et donc de traiter efficacement les patients atteints de tumeurs au cerveau (Salphati et al., 2010). Des travaux récents ont également validé le rôle des protéines MDR1 et BCRP1 dans la réduction de la biodisponibilité et l'efficacité des inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR (Becker et al., 2015; Hegedüs et al., 2012; Tang et al., 2014; Wu et al., 2017a).

### C.3 L'approche métabolique

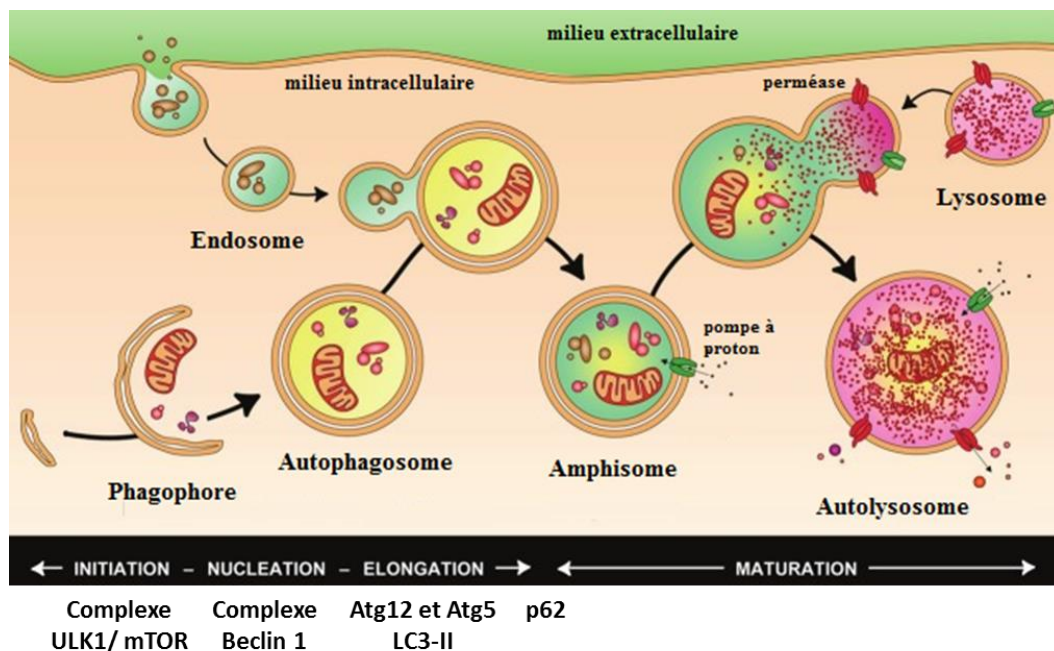
Les protéines mTORC1 et mTORC2 jouent des rôles importants dans le métabolisme énergétique intracellulaire. mTORC1 régule par exemple l'activité de la protéine SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*), un facteur de transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides (Laplante and Sabatini, 2009). Ce complexe est également impliqué dans la régulation de la glycolyse par le complexe protéique HIF-1 (*Hypoxia Inductible Factor 1*) ou encore dans la synthèse d'ATP (Poulain et al., 2017; Ramanathan and Schreiber, 2009). mTORC2, lui, est impliqué dans le métabolisme glycolytique en régulant le facteur de transcription FOXO (Masui et al., 2013). L'utilisation d'inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR chez les patients atteints de cancer provoque de nombreux effets métaboliques indésirables dont une hyperlipidémie ou une hyperglycémie (Vergès et al., 2014).

Depuis quelques années, le métabolisme cellulaire a été décrit comme étant un des mécanismes pour surmonter la résistance aux thérapies ciblées. Par exemple, l'inhibition simultanée du récepteur à l'IGF1 et de la voie PI3K/mTOR dans des lignées de cancer du sein inhibe de manière synergique la croissance tumorale (Martin and Baxter, 2007). Cela pourrait être lié à un nouveau rôle connu de la protéine VHL (Von Hippel-Lindau) dans l'inhibition de la transcription du récepteur à l'IGF. En effet, la stabilité de l'ARN de la protéine VHL est dépendante de l'hypoxie cellulaire qui peut être induite avec les inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR. L'inactivation du gène *VHL* conduit à une suractivation du récepteur à l'IGF et à une activation d'AKT qui peut entraîner une résistance (Cardillo et al., 2013). D'autres

mécanismes de résistance impliquant le métabolisme ont été rapportés incluant des dérégulations des senseurs cellulaires en oxygène, énergie ou nutriment. Une dérégulation de la signalisation de l'AMPK suite au blocage de la voie PI3K/mTOR a été reporté dans les tumeurs solides (Garcia-Donas et al., 2013). L'AMPK est le senseur du statut énergétique intracellulaire qui peut réduire l'activation de mTORC1 en activant TSC2.

#### **C.4 La voie autophagique**

La voie autophagique est un processus vésiculaire catabolique impliqué dans la régulation de l'homéostasie cellulaire. Elle est induite en réponse à différents types de stress intrinsèque ou extrinsèque à la cellule tels que la carence en nutriment, l'hypoxie ou les dommages à l'ADN. Dès lors, une structure multi-membranaire appelée phagophore se forme et s'allonge pour séquestrer du matériel cellulaire, formant ainsi une vésicule d'autophagie ou autophagosome. Cette vésicule fusionne avec un lysosome pour dégrader et recycler son contenu (protéines, lipides et organites) afin de synthétiser de nouvelles macromolécules et produire l'énergie nécessaire pour la cellule (Mehrpour et al., 2010). De nombreuses protéines autophagiques (appelées ATG pour « *autophagy-related gene* ») se lient à la membrane des phagophores pour participer à la formation des autophagosomes dont la protéine LC3 (LC3 I pour la forme cytosolique et LC3 II pour la forme associée aux autophagosomes). L'autophagie peut avoir un rôle antitumoral par son implication dans la réduction de l'instabilité chromosomique, de la prolifération et de l'inflammation des cellules tumorales. Cependant, de façon paradoxale, elle peut aussi avoir un rôle pro-tumoral en permettant la survie des cellules tumorales exposées à des variations de leur micro-environnement (hypoxie, carence nutritionnelle) ou à des traitements anticancéreux (Levine and Kroemer, 2008).



(Puissant et al., 2012)

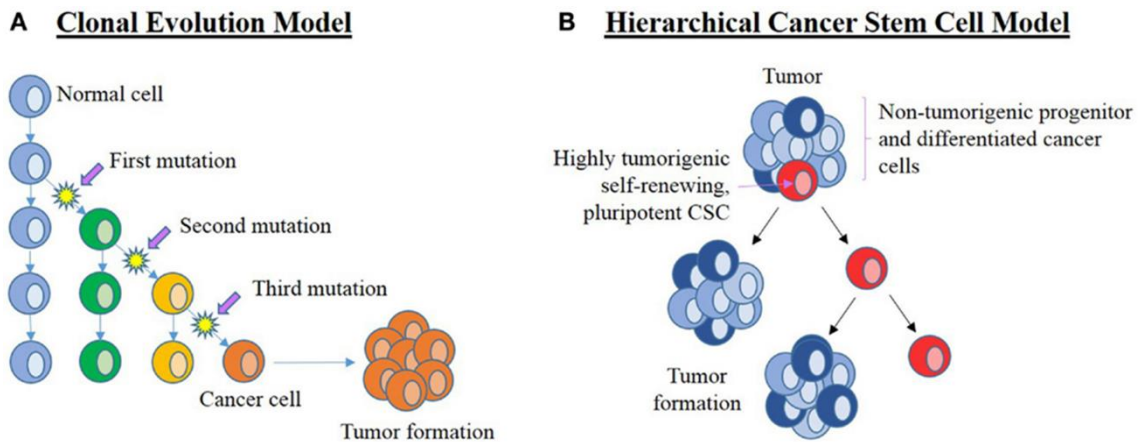
*Figure 21 : Les étapes de l'autophagie et sa régulation*

La régulation de l'autophagie est principalement sous le contrôle de deux protéines, BECLIN1 (*Coiled-Coil Myosin-Like Bcl2-Interacting Protein 1*) qui est impliquée dans l'initiation de l'autophagie et mTORC1 qui exerce un contrôle négatif sur le processus (White et al., 2011). Dans de nombreux modèles de cancer humain, il a été montré que l'activation de l'autophagie est un mécanisme de résistance aux inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR (Mao et al., 2017; Sun et al., 2017; Wu et al., 2013; Zhang et al., 2017). Dans les carcinomes à cellules rénales, la combinaison avec un inhibiteur du flux autophagique peut inverser la résistance aux inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR en inhibant plus fortement la croissance cellulaire et en induisant de l'apoptose (Li et al., 2013).

### C.5 Les cellules souches cancéreuses

Dans l'approche classique de l'évolution de la résistance aux drogues, les cellules cancéreuses sont sélectionnées et acquièrent une résistance aux médicaments pendant l'exposition à ceux-ci. Cependant, selon le concept des cellules souches cancéreuses (CSC), la résistance aux médicaments résulte principalement des mécanismes de résistance primaire ou secondaire accumulés dans la population des CSC. En effet, d'après ce concept, les cellules

souches prolifèrent assez longtemps pour accumuler toutes les mutations nécessaires pour la progression du cancer (Gil et al., 2008).



(Bradshaw et al., 2016)

*Figure 22 : Schéma des concepts de l'origine du cancer*

Les cellules souches possèdent des propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation. Elles seraient impliquées dans l'initiation tumorale, dans la résistance aux traitements et la rechute mais également dans le processus métastatique (O'Brien et al., 2010). L'identification des CSCs reste controversée car la spécificité de leurs marqueurs membranaires est contestée. Il a été montré notamment que la régulation de la croissance et de la prolifération des cellules souches est assurée par des voies de signalisations énergétiques dont l'AMPK et la voie PI3K/mTOR. De plus, dans le cancer de la prostate, le phénotype CSC a été associé à l'activation de la voie PI3K/mTOR (Chang et al., 2013). Dans les carcinomes et le cancer du sein, une activation de cette voie de signalisation a également été rapportée dans les cellules souches cancéreuses (Oliveras-Ferraros et al., 2014; Yang et al., 2013a). Etant donné que la signalisation de mTOR semble jouer un rôle important dans l'homéostasie des cellules souches cancéreuses, il a été suggéré que les mécanismes potentiels de résistance aux inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR apparaissent dans les CSC. Cependant, les mécanismes exacts de la résistance aux médicaments ciblant la voie PI3K/mTOR doivent encore être élucidés dans les futures recherches sur les cellules souches cancéreuses.

## Conclusions

Les léiomyosarcomes (LMS) sont des tumeurs malignes d'origine mésenchymateuse composées de cellules montrant des caractéristiques distinctes de différenciation musculaire lisse. Ils représentent jusqu'à 25 % des sarcomes des tissus mous de l'adulte. En dépit des bonnes avancées dans la prise en charge des patients notamment la chirurgie ainsi que les traitements incluant les chimiothérapies cytotoxiques et les thérapies ciblées, un nombre important de rechute ou d'apparition de métastases est observé chez les patients atteints de léiomyosarcomes. Le taux de survie des patients à 5 ans est de 64 % et le risque de développement métastatique est d'environ 40 %. Ces chiffres n'ont pas bougé depuis 20 ans. Il y a donc un réel besoin thérapeutique pour ces patients. De nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans la survie cellulaire et la rechute métastatique dont la voie intracellulaire PI3K/mTOR. Par ailleurs, il a été montré que cette voie joue un rôle majeur dans le développement des léiomyosarcomes.

L'objectif de ce travail de thèse s'inscrit dans un champ de recherche translationnelle visant à mieux comprendre la biologie des LMS et l'importance de la voie PI3K/mTOR comme cible thérapeutique dans cette pathologie afin d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les patients atteint de LMS.

Pour cela, nous avons étudié les effets antiprolifératifs et antitumoraux de plusieurs classes d'inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR dans différentes lignées de léiomyosarcomes incluant un inhibiteur de PI3K de classe I, un inhibiteur de mTOR et un inhibiteur ciblant à la fois les protéines PI3K et mTOR. Dans un second temps, nous avons développé, *in vitro* et *in vivo*, des modèles uniques de résistance secondaire à l'inhibiteur double cible de PI3K et mTOR, le BEZ235, afin d'étudier les mécanismes cellulaires impliqués dans la résistance au médicament et ainsi tenter d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour les léiomyosarcomes.



# **RESULTATS EXPERIMENTAUX**

## **Partie 1 - Sensibilité aux inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR**

## A. Résumé de l'article

La voie de signalisation PI3K/mTOR joue un rôle majeur dans la tumorigenèse des léiomyosarcomes (Gomez-Pinillos and Ferrari, 2012; Hernando et al., 2007). Une analyse à haut débit de plusieurs lignées cellulaires de LMS avec une bibliothèque de 480 inhibiteurs de kinase a confirmé l'importance de la voie de signalisation PI3K/mTOR pour la prolifération des cellules tumorales (Babichev et al., 2016). Ces résultats ont suggéré que l'utilisation d'inhibiteurs de cette voie de signalisation pourrait être associée à un bénéfice clinique chez les patients atteints de léiomyosarcomes.

Plusieurs inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR tels que le déforolimus ou le temsirolimus ont été évalués cliniquement chez les patients atteints de STM avancés (Italiano et al., 2011; Iwenofu et al., 2008). Cependant, les résultats très modestes observés pourraient être liés à des boucles de rétrocontrôle négatif impliquant la voie RAS/MPAK et la voie PI3K/mTOR elle-même (Courtney et al., 2010). Des agents multi-cibles inhibant à la fois l'activité catalytique des protéines PI3K et mTOR pourraient ainsi être associés à une meilleure efficacité.

Nous nous sommes donc intéressés au potentiel thérapeutique d'inhibiteurs de la voie de signalisation PI3K/mTOR. Le BEZ235 (un inhibiteur double cible de PI3K et de mTOR) mais aussi le BKM120, un inhibiteur spécifique de l'activité catalytique de PI3K, et l'évérolimus, un inhibiteur allostérique de mTOR, ont été étudiés *in vitro* dans trois lignées de léiomyosarcome (IB112, IB134 et IB136) et *in vivo*. Les effets sur la viabilité cellulaire et l'apoptose ainsi que les conséquences biologiques sur les régulations des voies de signalisation PI3K/mTOR et RAS/MAPK ont été analysées.

Nous avons observé une activité cytostatique dose-dépendante des trois composés. Cependant, l'inhibition de la croissance cellulaire observée était plus forte avec l'inhibiteur des deux cibles PI3K et mTOR plutôt qu'avec ceux inhibant une cible unique. Grâce aux analyses des tests d'apoptose par cytométrie en flux, nous avons constaté que ces composés ne possédaient pas ou peu d'effets cytotoxiques. En effet, seul le BEZ235 et le BKM120 à fortes concentrations ( $> 1 \mu\text{M}$ ) ont induit de l'apoptose cellulaire. Ces résultats nous ont conduits à tester l'efficacité de ces agents dans un modèle de souris. Pour cela, nous avons injecté, en sous-cutanée, 5 millions de cellules tumorales afin d'induire des tumeurs. Seule la lignée IB136 a permis l'obtention de xénotransplante de LMS. Après l'administration des différents composés par voie orale pendant trois semaines, nous avons constaté une activité antitumorale de l'inhibiteur double cible PI3K et mTOR plus importante que celle observée pour les inhibiteurs de PI3K et mTOR seuls.

Par la suite, nous avons étudié les conséquences de l'utilisation de ces inhibiteurs sur les deux grandes voies de signalisation cellulaire impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire, la voie RAS/MAPK et la voie PI3K/mTOR. Nous avons démontré que l'inhibition simultanée des kinases PI3K et mTOR provoque une activation paradoxale de la voie RAS/MAPK par le complexe mTORC2 suggérant un rôle important de cette protéine dans l'interaction entre ces deux voies de signalisation. Cette observation nous a permis de poser l'hypothèse d'une synergie pouvant être obtenue grâce à la combinaison d'un inhibiteur double cible de la voie PI3K/mTOR et d'un inhibiteur de la voie RAS/MAPK. Nous avons ainsi montré une synergie *in vitro* en termes de viabilité cellulaire, d'induction d'apoptose ou d'inhibition de croissance tumorale et confirmé nos résultats sur des modèles *in vivo*. Ces résultats ouvrent ainsi des perspectives de nouvelles stratégies thérapeutiques chez les patients atteints de léiomyosarcomes avancés.

**B. Article : “Dual inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway suppresses the growth of leiomyosarcomas but leads to ERK activation through mTORC2: Biological and clinical implications.”**

Benjamin Fourneaux<sup>1,2</sup>, Vanessa Chaire<sup>1,2</sup>, Carlo Lucchesi<sup>2</sup>, Marie Karanian<sup>3</sup>, Raphael Pineau<sup>1</sup>, Audrey Laroche-Clary<sup>1,2</sup>, Antoine Italiano<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Université de Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>2</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1218, Institut Bergonié, Bordeaux, France

<sup>3</sup> Department of Medical Oncology, Institut Bergonié, Bordeaux, France

Oncotarget, 2017, 8(5):7878-7890. Doi: 10.18632/oncotarget.13987

## Dual inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway suppresses the growth of leiomyosarcomas but leads to ERK activation through mTORC2: biological and clinical implications

Benjamin Fourneau<sup>1,2</sup>, Vanessa Chaire<sup>1,2</sup>, Carlo Lucchesi<sup>2</sup>, Marie Karanian<sup>3</sup>, Raphael Pineau<sup>1</sup>, Audrey Laroche-Clary<sup>1,2</sup>, Antoine Italiano<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Université de Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Institut Bergonié, Bordeaux, France

<sup>3</sup>Department of Medical Oncology, Institut Bergonié, Bordeaux, France

**Correspondence to:** Antoine Italiano, **email:** A.Italiano@bordeaux.unicancer.fr

**Keywords:** leiomyosarcomas, PI3K/AKT/mTOR pathway, BEZ235, BKM120, everolimus

**Received:** September 14, 2016

**Accepted:** December 05, 2016

**Published:** December 16, 2016

### ABSTRACT

The PI3K/AKT/mTOR pathway plays a crucial role in the development of leiomyosarcomas (LMSs). In this study, we tested the efficacy of dual PI3K/mTOR (BEZ235), PI3K (BKM120) and mTOR (everolimus) inhibitors in three human LMS cell lines. *In vitro* and *in vivo* studies using LMS cell lines showed that BEZ235 has a significantly higher anti-tumor effect than either BKM120 or everolimus, resulting in a greater reduction in tumor growth and more pronounced inhibitory effects on mitotic activity and PI3K/AKT/mTOR signaling. Strikingly, BEZ235 but neither BKM120 nor everolimus markedly enhanced the ERK pathway. This effect was reproduced by the combination of BKM120 and everolimus, suggesting the involvement of mTORC2 via a PI3K-independent mechanism. Silencing of RICTOR in LMS cells confirmed the role of mTORC2 in the regulation of ERK activity. Combined treatment with BEZ235 and GSK1120212, a potent MEK inhibitor, resulted in synergistic growth inhibition and apoptosis induction *in vitro* and *in vivo*. These findings document for the first time that dual PI3K/mTOR inhibition in leiomyosarcomas suppress a negative feedback loop mediated by mTORC2, leading to enhanced ERK pathway activity. Thus, combining a dual PI3K/mTOR inhibitor with MEK inhibitors may be a relevant approach to increase anti-tumor activity and prevent drug resistance in patients with LMS.

### INTRODUCTION

Leiomyosarcomas (LMSs) are an uncommon group of malignant tumors composed of cells that show distinct smooth muscle differentiation and that represent 15–20% of all soft-tissue sarcomas, making LMS one of the most frequent sarcoma subtypes [1]. The current interventions for leiomyosarcoma include surgical excision, radiotherapy and chemotherapy with an aggressive approach taken for high-grade tumors [2]. However, the prognosis is poor, with up to 40% of patients experiencing metastatic relapse despite optimal locoregional treatment [3, 4]. Further options for the treatment of LMSs are needed.

From a genetic point of view, LMSs are characterized by numerous genomic alterations, which include multiple regions of genomic amplifications and

deletions [5–9]. Among these regions, a large region of deletion on chromosome 10 encompassing PTEN (phosphatase and tensin homolog), a tumor suppressor gene and negative regulator of phosphoinositide-3-kinase (PI3K), is one of the most frequent aberrations (40–50% of cases). Moreover, *in vitro* and *in vivo* studies have highlighted the critical role of the PI3K/mTOR pathway in smooth muscle transformation and LMS development [10]. In these studies, mTOR inhibition was associated with significant anti-tumor activity [11]. These data have been recently confirmed in the clinical setting by a pilot study of patients with advanced leiomyosarcoma who were treated with temsirolimus with significant benefit [12]. Moreover, immunohistochemical evaluation of the downstream target of mTOR, phosphorylated S6 ribosomal protein (p-S6RP), has been correlated with an

early clinical response to mTOR inhibitors (AP23573) administered either alone or in combination to a cohort of patients with varying types of sarcomas [13]. However, several studies have shown that inhibition of mTOR by rapamycin and its analogs is associated with a loss of negative feedback control of the MAPK pathway [14] and PI3K/AKT/mTOR pathway in solid tumors [15, 16]. This finding may explain the transient benefit observed with mTOR inhibitors in a clinical setting and the need for more potent strategies to target this pathway [17].

PI3K and mTOR both belong to the PI3K-related kinase superfamily and share structural domains. Consequently, certain inhibitory compounds target both kinases [18]. Dual inhibitors of PI3K and mTOR target the active sites of both holoenzymes to inhibit the pathway both upstream and downstream of AKT, thus avoiding the problem of AKT activation following abolition of the mTORC1-S6K-IRS-1 or S6K-mTORC2-AKT negative feedback loops. This aberrant activation is known to occur with rapalogs such as sirolimus, everolimus and temsirolimus [15, 16, 19]. Moreover, a recent pre-clinical study has shown favorable selective activity of these inhibitors in LMS cell lines [20]. Here, we report an original study investigating the effects of dual inhibition of PI3K and mTOR in human leiomyosarcomas on anti-tumor activity, especially the biological consequences on components of the PI3K/AKT/mTOR and RAS/MEK/ERK pathways.

## RESULTS

### PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors inhibited proliferation and caused apoptosis in LMS cell lines

For the purposes of this study, we used three LMS cell lines derived from surgical specimens obtained from consenting patients. All patient tumors displayed the loss of PTEN expression and strong p-S6RP<sup>S240/244</sup> staining indicating sustained overactivation of the PI3K/AKT/mTOR pathway (Figure 1). LMS cells derived from patient tumors showed similar p-S6RP<sup>S240/244</sup> staining, but in the absence of endothelial cells in the LMS cell line pellets, interpretation of PTEN staining could not be performed (Figure 1). We assessed the respective anti-tumor activity of the following PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors: BEZ235 (dual inhibitor of PI3K, mTORC1 and mTORC2), BKM120 (PI3K inhibitor) and everolimus (mTORC1 inhibitor). We observed dose-dependent growth suppression that was more strongly induced in all cell lines by BEZ235 (IC<sub>50</sub> range, 0.001 to 0.1  $\mu$ M) than by either BKM120 or everolimus (range, 0.01 to 1.6  $\mu$ M; Figure 2A). Additionally, after treatment with the respective IC<sub>50</sub> values of inhibitors for 72 hours, all leiomyosarcoma cell lines exhibited a significant

decrease in colony formation in the clonogenic assays upon exposure to BEZ235 compared with either BKM120 or everolimus (Figure 2B). Compared to cells with untreated medium (control), colony formation by IB112, IB134 and IB136 cells was reduced approximately 60% after treatment with BEZ235 at its IC<sub>50</sub> value (Figure 2C), while cells exhibited a range of 10–20% (with BKM120) and 30–45% (with everolimus) inhibition of colony formation (Figure 2C). Interestingly, we failed to detect any significant induction of apoptosis in LMS cells with PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors at the same concentration (Figure 3B). Only exposure to high doses of BEZ235 and BKM120 led to induction of apoptosis as revealed by 40% and 65% increases in the percentage of annexin V- and PI-positive cells compared to control cells (Figure 3A and 3B). No effect was observed with everolimus.

### BEZ235 induced ERK pathway activation

We further explored the capacity of these drugs to inhibit downstream kinases of the PI3K/AKT/mTOR pathway by western blotting using phosphorylation of both AKT and S6RP as a marker of pathway activation. Consistent with the proliferation results, BEZ235 was most effective in inhibiting p-S6RP<sup>S240/244</sup> in the 3 LMS cell lines. This observation indicated a more complete blockade that was quickly achieved and sustained with dual PI3K/mTOR inhibition (Figure 4A). As expected and described in several studies, everolimus enhanced p-AKT<sup>S473</sup> accumulation consequent to suppression of the S6K-mTORC2-AKT feedback loop [19]. Strikingly, BEZ235 markedly induced ERK activation, while this effect was not observed with either BKM120 or everolimus (Figure 4A and 4B). However, we wondered whether the combination of BKM120 and everolimus could reproduce the accumulation of p-ERK<sup>T202/Y204</sup> observed with BEZ235 treatment. Synergy between BKM120 and everolimus was observed on LMS cell line growth, with median combination indices of 0.62 for IB112, 0.1 for IB134 and 0.1 for IB136 (Supplementary Figure S1A), and on apoptosis induction only for the IB136 cell line, with an increase in the percentage of annexin V- and PI-positive cells (30%) compared with monotherapy (20% for BKM120 and 13% for everolimus; Supplementary Figure S1B and S1C). Interestingly, dual inhibition of PI3K and mTORC1 by the combination of BKM120 and everolimus mimicked the effects of BEZ235 to induce MAPK pathway activation (Supplementary Figure S1D). Considering the similar effect on MAPK pathway activation observed with BEZ235, we hypothesized that p-ERK<sup>T202/Y204</sup> accumulation could be caused by a feedback mechanism implicating RICTOR, a scaffold protein from the mTORC2 complex that is known to be regulated by S6K1 [19].

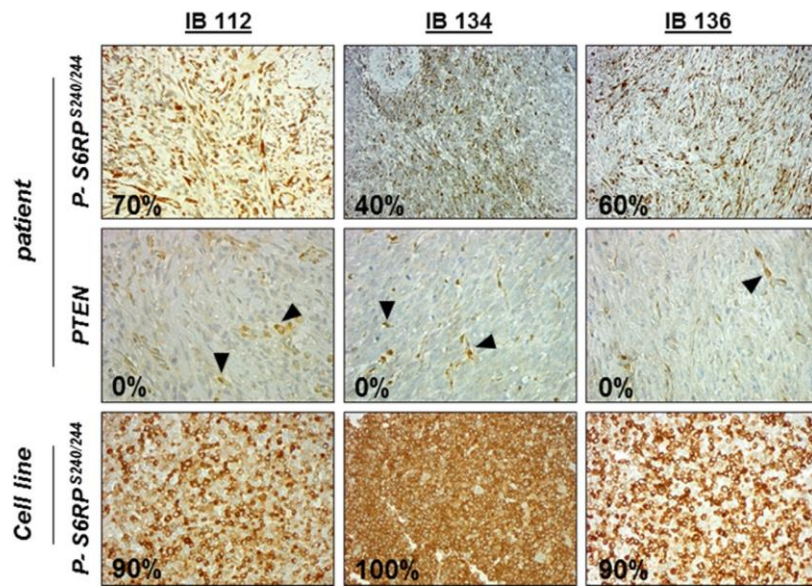


Figure 1: Immunohistochemical (IHC) staining against p-S6RP<sup>ser240/244</sup> and PTEN in leiomyosarcoma (LMS) disease tissues and cell lines. Immunohistochemical staining pictures of LMS tissue samples with anti-p-S6RP<sup>ser240/244</sup> and anti-PTEN antibodies and of cell line pellets with anti-p-S6RP<sup>ser240/244</sup>. Endothelial cells (positive control) are indicated by black arrows.

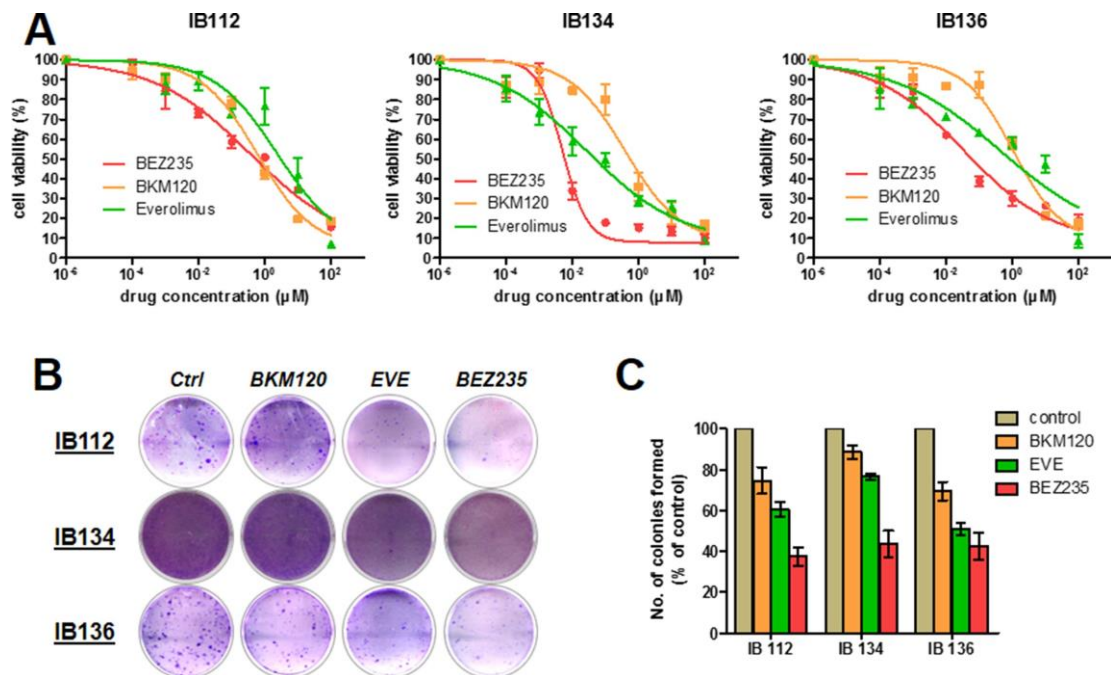


Figure 2: Antiproliferative and apoptotic activities of BEZ235, BKM120 and everolimus (EVE) in LMS cell lines. Growth curves indicating growth inhibition of the 3 LMS cell lines (IB112, 134 and 136) after treatment for 72 hours (A). Representative pictures of the clone formation assay for cell lines treated for 72 hours by PI3K/mTOR pathway inhibitors at their IC<sub>50</sub> value (B). The average percentage of mono-clonal cell number for each cell line (C).



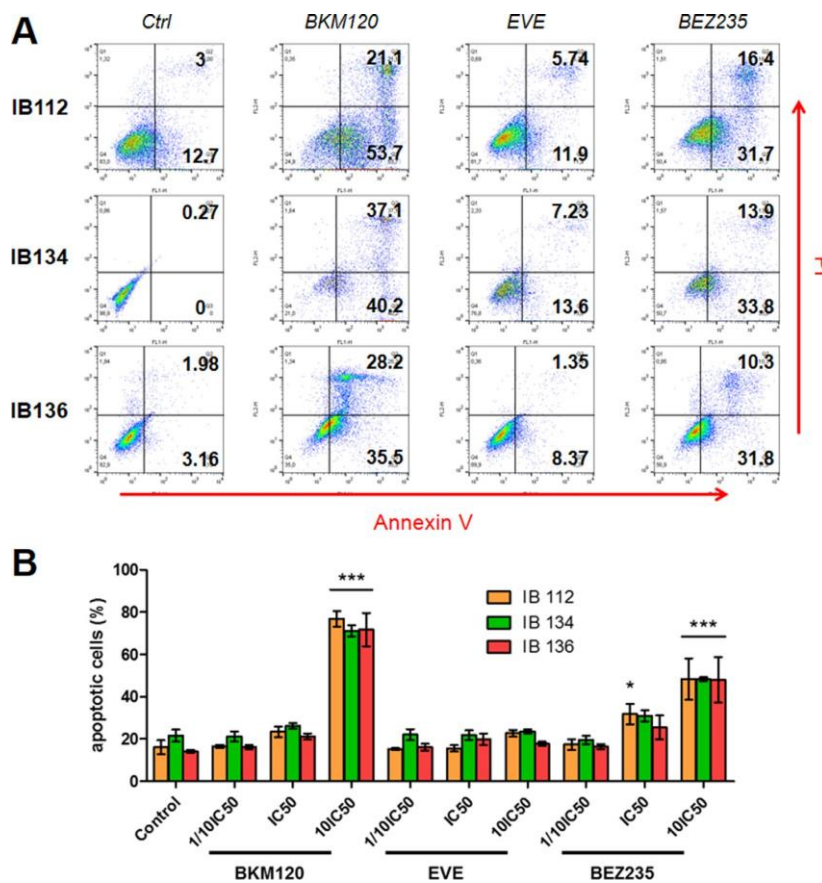
**Leiomyosarcoma xenografts were more sensitive to dual PI3K/mTOR inhibition than PI3K or mTORC1 inhibition alone**

These *in vitro* findings prompted us to examine the effect of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors on LMS tumor growth. For the *in vivo* study, BKM120 was replaced with GDC-0941, another PI3K inhibitor. IB136 xenografts were established and grew to a size of 100 mm<sup>3</sup>, after which either vehicle or drugs were given 5 days a week for 3 weeks. The growth suppression induced by BEZ235 was more significant in LMS xenografts (Figure 5A). The average inhibition tumor growth (ITG) of tumors from the BEZ-treated animals was 65%, whereas those from the GDC-0941 and everolimus groups were 27% (*p* < 0.05) and 54% (*p* < 0.05), respectively, compared to the control group (*p* < 0.05). No apparent toxicity events were observed in the drug-treated animals. There were no

significant changes in animal weight (data not shown). The number of tumor cells positive for Ki-67, a cell proliferation marker, was substantially lower in tumors treated with BEZ235 compared with control tumors (Figure 5B). With regard to the cellular pathway involved, as shown in the representative immunohistochemistry images, tumor xenografts from the BEZ235-treated group showed a marked decrease in the number of p-S6RP<sup>S240/244</sup>-positive cells compared with the other groups. Therefore, these pharmacodynamic assessments confirmed the *in vitro* activity of the drugs in terms of proliferation and pathway inhibition.

**Extinction of RICTOR-enhanced ERK activation**

To understand whether mTORC2 was involved in ERK pathway activation, we used RNAi to silence

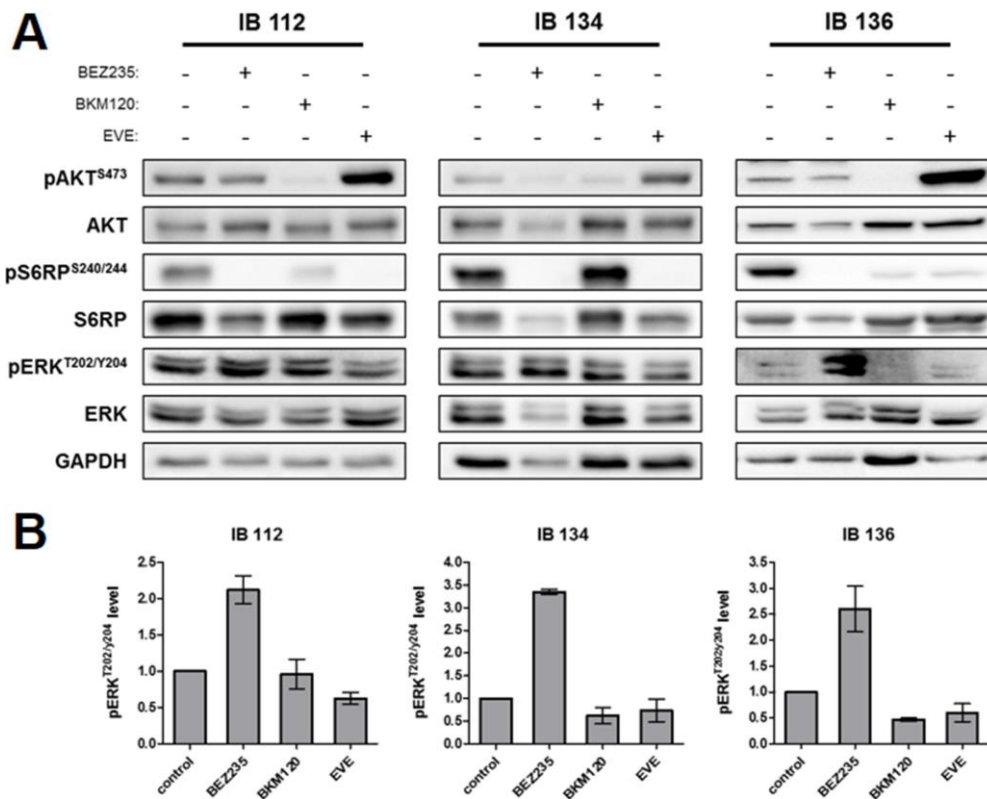


**Figure 3: Effect of BEZ235, BKM120 and everolimus (EVE) on LMS cell apoptosis.** Representative dot-plot diagrams of flow cytometry with annexin V/PI for LMS cells treated for 72 hours with BEZ235, BKM120 and EVE at 10-fold IC<sub>50</sub> values (A). Percentage of apoptotic cells after treatment for 72 hours with 3 drug concentrations (1/10 IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> value, 10-fold IC<sub>50</sub>) (B). Data are presented as the mean ± SEM of three independent experiments. \*, drug *p* < 0.05 vs. control; \*\*\*, drug *p* < 0.001 vs. control (two-way ANOVA).

RICTOR, an essential and specific component of mTORC2. As expected, RNAi did not alter the kinase expression of AKT and S6RP and resulted in a 50–90% decrease of RICTOR protein expression levels compared to non-targeting RNAi in LMS cell lines (Figure 6A and quantification in Figure 6B for IB134; Supplementary Figure S2 for IB112 and IB136). Additionally, silencing of RICTOR did not disrupt mTORC1/S6K activity as scored by p-S6RP<sup>S240/244</sup> but abolished AKT phosphorylation on Ser<sup>473</sup>, a modification mediated by mTORC2. Interestingly, in RICTOR-silenced LMS cells, we showed p-ERK<sup>T202/Y204</sup> accumulation similar to the enhancement caused by BEZ235 treatment (Figure 6A and quantification in Figure 6B for IB134; Supplementary Figure S2 for IB112 and IB136). Transfection with RNAi (AM16708-39500, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) targeting a different region of RICTOR mRNA also resulted in accumulated p-ERK<sup>T202/Y204</sup> (data not shown). Thus, these results confirmed our hypothesis that mTORC2 is involved in MAPK pathway activation.

**GSK1120212 potentiated apoptosis induction and the anti-tumor effect of BEZ235**

We showed that BEZ235 induced an accumulation of p-ERK<sup>T202/Y204</sup> protein, a marker of MAPK pathway activation. The crosstalk between the PI3K and MAPK pathways has long been known. In fact, PI3K and mTOR blockade may result in the activation of compensatory pathways of MAPK that could potentially reduce the anti-tumor effects of PI3K/mTOR inhibitors [21]. Thus, we decided to further investigate the effects of combined targeting of the MAPK and PI3K/AKT/mTOR signaling cascades in leiomyosarcoma cells. To this end, we administered a diagonal constant ratio combination design of BEZ235 and GSK1120212, a potent MEK inhibitor, in LMS cell lines according to the Chou and Talalay proposition [22]. *In vitro* synergy was observed with BEZ235 in association with GSK1120212 on the growth of LMS cell lines with median combination indices of 0.72 for IB112, 0.25 for IB134 and 0.4 for IB136 (Figure 7A)



**Figure 4: Downstream kinase inhibition by BEZ235, BKM120 and everolimus (EVE) in LMS cell lines.** Representative western blotting of active kinase and total kinase levels of the PI3K/mTOR and MAPK pathway with GAPDH as a loading control (A). Cells were treated for 72 hours at IC50 value of each drug. Representative signal intensities for p-ERK1/2<sup>thr202/tyr204</sup> were normalized to those for total ERK in each cell line (B). Data are presented as the mean ± SEM of three independent experiments.

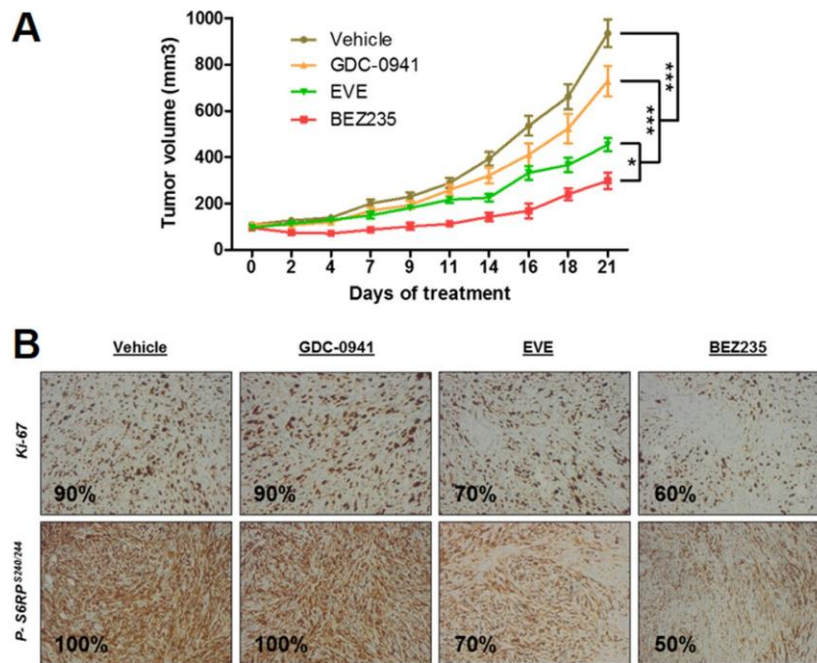
and on apoptosis induction with an increase in the percentage of annexin V- and PI-positive cells (range of apoptotic cells, 44–66%) compared with either drug alone (range of apoptotic cells, 10–27% for BEZ235 and 23–41% for GSK1120212) as shown in Figure 7B and 7C. Additionally, after exposure at the IC<sub>50</sub> value for 72 hours, GSK1120212 was effective in inhibiting p-ERK<sup>T202/Y204</sup> in all LMS cell lines, and as expected, due to presence of crosstalk between the PI3K and MAPK pathways, we observed p-AKT<sup>S473</sup> accumulation consequent to the suppression of MAPK pathway activity (Figure 7C) [16]. This treatment combined with BEZ235 prevented ERK and AKT over-activation induced by BEZ235 and GSK1120212 alone, respectively (Figure 7C).

Moreover, we tested whether the MAPK pathway blockade could enhance the anti-tumoral effect of the dual PI3K/mTOR inhibitor *in vivo*. IB136 xenografts were established and grew to a size of 100 mm<sup>3</sup>, after which either vehicle or drugs were given 5 days a week for 3 weeks. The BEZ235 and GSK1120212 combination group showed a stronger anti-tumor effect with a significant ( $p < 0.001$ ) reduction of tumor growth (average tumor volume at endpoint, 428.5 ± 70.2 mm<sup>3</sup>) compared with either drug alone (1193.9 ± 112.1 mm<sup>3</sup> for BEZ235 and 910.5 ± 143.1 mm<sup>3</sup> for GSK1120212) or vehicle (1591 ± 90.8 mm<sup>3</sup>) as shown in Figure 8A. Also, the survival of mice (from the first day of the

experiment until the day when the tumor size doubled) showed that the combination treatment highly significantly slowed the rate of tumor growth (9.4 days for median survival) compared to the control (5.8 days) and to the individual drug (6.4 days) treatment groups ( $p < 0.0001$ ) as shown in Figure 8B. No apparent toxicity events were observed in the drug-treated animals. There were no significant changes in animal weight (data not shown). Further analyses by immunohistochemical experiments showed that the number of tumor cells positive for Ki-67 was substantially less in LMS tumors treated with the combination treatment compared with tumors treated with either drug alone or control tumors (Figure 8C).

### DISCUSSION

We report an original study assessing the respective *in vitro* and *in vivo* effects of a drug panel targeting different components of the PI3K/AKT/mTOR pathway on human leiomyosarcoma, an extremely rare form of cancer. This pathway is one of the most frequently dysregulated signaling cascades in cancer [23]. One challenge related to the development of anti-cancer drugs targeting this signaling cascade is to identify agents capable of achieving sufficiently strong inhibition of the pathway (and the subsequent anti-tumor activity). Dual inhibitors of PI3K and mTOR, such as BEZ235, target the

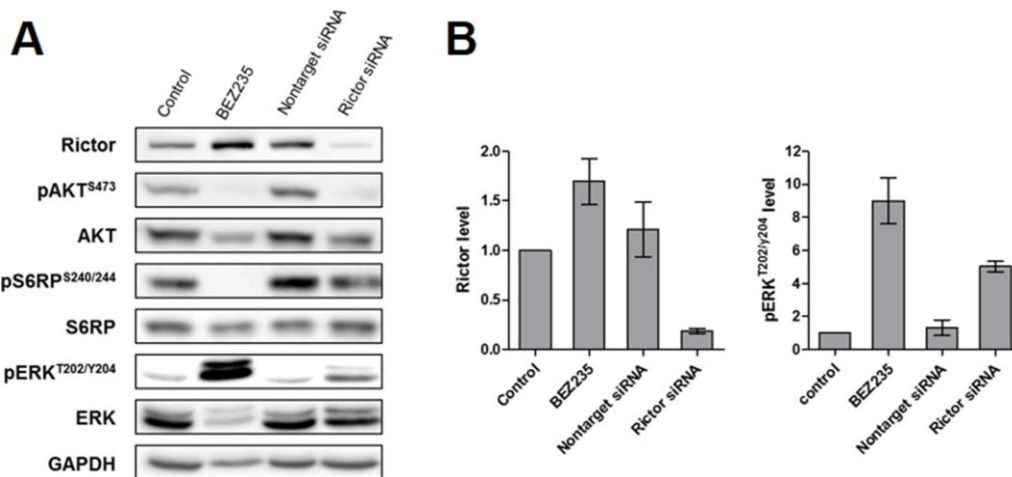


**Figure 5: Anti-tumor effect of BEZ235, BKM120 and everolimus (EVE) on human IB136 cell xenografts in Ragγ2C-/- mice.** Curves of tumor volume progression during 3 weeks of treatment (A) Mice were randomly assigned to receive 40 mg/kg BEZ235, 50 mg/kg GDC-0941, 5 mg/kg everolimus or vehicle. The data points represent an average from 8 mice (bars, SEM). \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , two-way ANOVA. Immunohistochemical staining images of tumor samples treated with anti-p-S6RP<sup>S140/244</sup> and anti-Ki-67 antibodies (B).

active sites of both holoenzymes, inhibiting the pathway both upstream and downstream of AKT and avoiding the problem of AKT activation following the abolition of the mTORC1-S6K-IRS-1 negative feedback loop [24]. The loss of this feedback loop is known to occur with rapalogs, the first PI3K pathway-targeted agents approved for the treatment of cancer. Dual inhibitors are also expected to be more active than pan-PI3K inhibitors, particularly in tumors with alterations downstream of PI3K and upstream of mTOR (e.g., PTEN or TSC1/2), such as LMS [25]. We have demonstrated that dual inhibition of PI3K and mTOR is associated with strong anti-tumor activity in LMS, which was significantly higher than that of either mTOR inhibition (everolimus) or PI3K inhibition (BKM120) alone. Viability changes were reflected in the apoptotic effects produced by BEZ235, while apoptosis was not observed with everolimus, indicating that PI3K is sufficient for cell survival.

Another important challenge for the development of drugs targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway is the elucidation of acquired resistance mechanisms that either restore PI3K signaling or activate parallel pathways in the presence of inhibitors. The existence of redundancy and feedback loops between the RAS-RAF-MEK-ERK and PI3K-AKT-mTOR signaling networks is undisputed [26]. mTOR nucleates two distinct multi-protein complexes, the mTOR complex 1 (mTORC1) and mTOR complex 2 (mTORC2). In contrast to mTORC1, for which many upstream signals and cellular functions have been defined, relatively little is known about mTORC2 biology. Several studies have shown that mTORC2 plays key roles in various biological processes including cell survival,

metabolism, proliferation and cytoskeletal organization [27]. It has been shown that allosteric mTORC1 inhibitors such as everolimus can lead to activation of the ERK pathway as a result of a PI3K-dependent mechanism, thus adding a new level of complexity to the previously described negative feedback loop involving mTORC1/PI3K/AKT [14]. We found that the dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 profoundly inhibits mTORC1, mTORC2, and PI3K but induces overactivation of the RAS/MEK/ERK pathway in LMS cells. To understand the mechanism by which dual PI3K/mTOR inhibitors such as BEZ235 promoted ERK activation, we determined the role of the previously described feedback loop involving mTORC1/S6K/PI3K/ERK in response to rapamycin analogs [15, 16]. Neither mTORC1 inhibition (everolimus) nor PI3K inhibition (BKM120) at concentrations that completely blocked the mTORC1/S6K axis produced any detectable enhancement of ERK activation in LMS cells, suggesting a PI3K-independent mechanism. Strikingly, we observed that the combination of BKM120 and everolimus induced MAPK pathway activation similar to BEZ235, raising the possibility that this activation was the result of the suppression of a negative feedback loop involving mTORC2. Indeed, S6K1 (activated by mTORC1) and TSC1/2 (inhibited by PI3K/AKT) negatively and positively regulate mTORC2, respectively [28]. To confirm this hypothesis, we used RNAi to silence RICTOR, a scaffold protein in the mTORC2 complex. We observed that knockdown of RICTOR increased the baseline levels of ERK phosphorylation similar to BEZ235 treatment (Figure 6 and Supplementary Figure S2). Therefore, we showed that dual inhibition of PI3K/mTOR



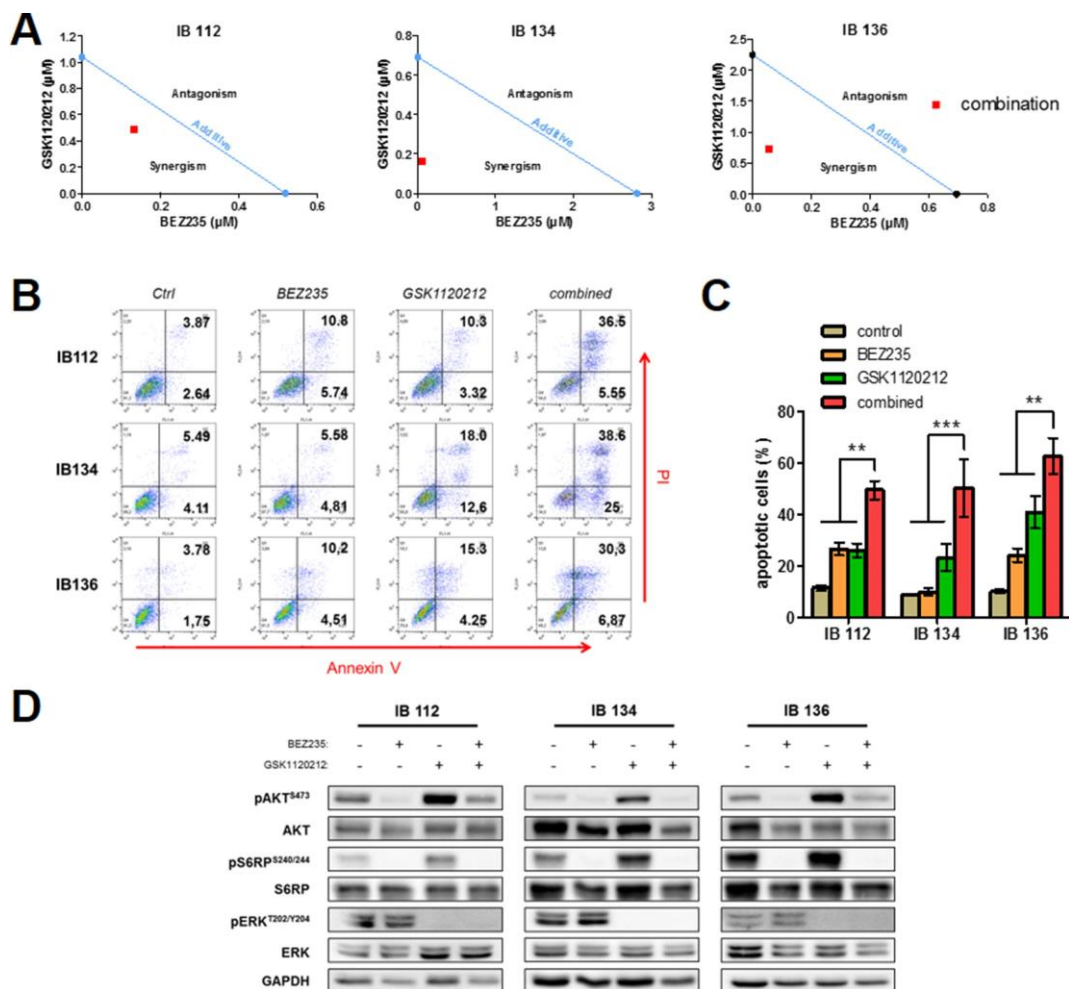
**Figure 6: Effect of RICTOR silencing on the PI3K and MAPK downstream signaling pathways in the IB134 cell line.** Representative western blotting of active kinase and total kinase levels of the PI3K/mTOR and MAPK pathway with GAPDH as a loading control (A). LMS cell lines were incubated with BEZ235 and RNAi against RICTOR for 72 hours. Representation of the signal intensities for RICTOR and p-ERK1/2<sup>thr202/tyr204</sup> were normalized to those for GAPDH and ERK, respectively (B). Data are presented as the mean ± SEM of two independent experiments.



suppresses a PI3K-independent feedback loop involving mTORC2 and results in MAPK pathway activation in LMS cells. Interestingly, an identical finding was reported in a pancreatic cancer model, suggesting a common effect for different malignancies [29].

Given the overactivation of the RAS/MEK/ERK pathway induced by BEZ235, we investigated whether this effect could counterbalance the growth-suppressive action of dual mTOR/PI3K inhibition in LMS cells. We found that the use of the MEK inhibitor GSK1120212 abrogated the effect of BEZ235 on p-ERK<sup>T202/Y204</sup> accumulation, resulting in a synergistic increase in LMS cell apoptosis

and significantly higher inhibition of tumor growth. Thus, in addition to the cytostatic effect, this multidrug combination exerted cytotoxic effects (Figure 7). This result is in agreement with that from Soares *et al.*, who showed that MEK1/2 inhibition suppressed the enhanced ERK activation induced by PI3K/mTOR dual inhibitors and enhanced the effects of growth inhibition due to BEZ235 in pancreatic cancer cells. Importantly, we were able to confirm our *in vitro* findings *in vivo* with a statistically significant greater anti-tumor effect of the BEZ235 and GSK1120212 combination versus the same agents used as monotherapies (Figure 8).



**Figure 7: Synergistic activity of the BEZ235 and GSK1120212 combination in IB112, 134 and 136 LMS cell lines.** Isobologram analysis of the combination of BEZ235 and GSK1120212 in LMS cells (A). Combination index (CI) values for each cell line were calculated using the method developed by Chou and Talalay and are represented by a red point. Representative dot-plot diagrams of the flow cytometry results with annexin V/PI for LMS cells treated with BEZ235 and GSK1120212 either alone or in combination (B). Percentage of apoptotic cells after respective treatments (C). Immunoblotting analysis of active kinase and total kinase levels of the PI3K/mTOR and MAPK pathway with GAPDH as a loading control (D). Cells were treated for 72 hours at the IC<sub>50</sub> value of each drug. Data are presented as the mean ± SEM of three independent experiments. \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001, two-way ANOVA.

There are few examples of the successful use of targeted inhibitors to disrupt the aberrant signaling pathways that malignant mesenchymal tumors require for continued growth. These examples include imatinib-mediated inhibition of c-KIT in gastrointestinal stromal tumors [30], inhibition of PDGFR- $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor) by imatinib in dermatofibrosarcoma protuberans [31], mTOR inhibition in perivascular epithelioid cell tumors [32] and EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) inhibition in INI1-or SMARCA4-deficient sarcomas [33]. Our pre-clinical results suggest that dual targeting of the PI3K/AKT/mTOR pathway in combination with MAPK inhibition is a promising therapeutic strategy against leiomyosarcoma.

**MATERIALS AND METHODS**

**Cell lines**

The cell lines used in this study were provided by the Biological Resources Center of Institut Bergonié (CRB-IB). Experiments were performed in accordance with the French Public Health Code (articles L. 1243-4 and R. 1243-61). The soft tissue leiomyosarcoma cell lines IB112 and IB136 and the uterine leiomyosarcoma cell line IB134 were derived from human surgical STS (soft-tissue sarcoma) specimens after obtaining patient consent and were established as previously described

[34]. Authentication of the cell lines was performed using aCGH by comparing the cell line with the corresponding originating tumor. All cell lines were cultured in RPMI 1640 medium, GlutaMAX<sup>TM</sup> Supplement (Sigma-Aldrich Life Technologies, Saint Louis, MO, USA) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin, and 0.2% Normocin (InvivoGen, Toulouse, France) at 37 C in an environment containing 5% CO<sub>2</sub>. Cells were routinely passaged every 2 to 3 days.

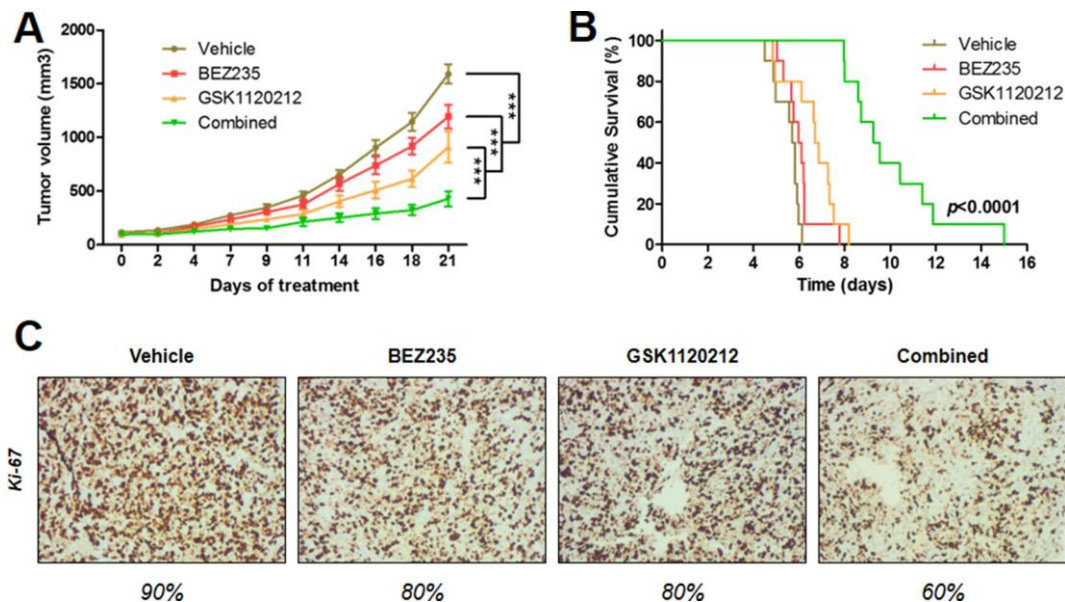
**Inhibitor treatments**

BEZ235 (dual PI3K/mTOR inhibitor), BKM120 (PI3K inhibitor), everolimus (mTOR inhibitor) and GSK1120212 (MEK inhibitor) were purchased from Selleck Chemicals (Houston, TX, USA) and were prepared as 2.1 mmol/L, 24 mmol/L, 10 mmol/L and 14 mmol/L stock solutions, respectively, in DMSO and stored at -80 C. Cultured cells were treated for 72 hours with a medium changes and fresh drug additions as indicated in the figure legends.

**Growth analyses**

**Cell viability assay**

Cells were seeded in triplicate at 5000 cells/well into 96-well plates, cultured with fresh growth medium for



**Figure 8: Synergistic anti-tumor effect of the BEZ235 and GSK1120212 combination in human IB136 cell xenografts in Rag2C-/- mice.** Curves of tumor volume progression during 3 weeks of treatment (A). Mice were randomly treated with vehicle, 10 mg/kg BEZ235, 0.5 mg/kg GSK1120212 or a combination of both drugs. The data points represent an average from 10 mice (bars, SEM). \*\*\**p* < 0.001, two-way ANOVA. Kaplan-Meier curves for tumor doubling times (B). Immunohistochemical staining images of tumor samples treated with the anti-Ki-67 antibody (C).

at least 24 hours and treated with a range of increasing concentrations of drugs for 72 hours. After the incubation period, 2-deoxyglucose (2-DG) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) were immediately added to the wells at a final concentration of 0.5 mg/mL, and the cells were incubated for 3 hours. Then, the supernatant was discarded, 100  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) was added, and the absorbance was monitored using a Flexstation 3 Plate reader (Sunnyvale, CA, USA) at 570 nm with 630 nm as a reference. The half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was calculated with GraphPad Prism software version 5.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Each experiment was repeated at least 3 times.

### Clonogenic cell survival assay

After cell trypsinization with 1 mL trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich Life Technologies, Saint Louis, MO, USA) and inactivation with medium containing 10% FBS, cells were seeded in triplicate at 150–200 cells per well into 6-well plates. The clones were allowed to grow for 15 days in growth medium with specific drugs at 37°C in an environment containing 5%  $CO_2$ . The number of cell colonies was counted after fixing with 70% ethanol and staining with crystal violet. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM percentage values.

### Cell apoptosis assay

STS (soft-tissue sarcoma) cells ( $2 \times 10^5$ /well) were seeded in 6-well plates and treated for 72 hours with several specific drug concentrations. After treatment, cells were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) and labeled with annexin-V-FITC and propidium iodide (PI) according to the manufacturer's protocol (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Then, cells were analyzed with a FACS (fluorescent activating cell sorting) Calibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The percentage of cells in early apoptosis (annexin-V-positive, PI-negative) and in late apoptosis or necrosis (annexin-V- and PI-positive) was calculated using FlowJo version 7.6.3 for Windows (Tree Star Inc, Ashland, OR, USA). The percentages of overall death (sum of early and late apoptosis) are represented as the mean  $\pm$  SEM values based on 3 independent experiments.

### Western blotting

Treated and control whole cells were harvested using 60  $\mu$ L radio-immunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer [35]. The lysate was centrifuged (13 000 rpm, 15 min, 4°C), and the supernatant was stored at  $-80^\circ C$  until further use. Total proteins (30  $\mu$ g) were electrophoresed on an 8, 12 or 15% sodium dodecyl sulfate (SDS)

polyacrylamide gel and transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Blots were probed overnight at 4°C in 5% BSA (bovine serum albumin) in PBST (phosphate, 100 mM; KCl, 27 mM; NaCl, 1.37 M, pH 7.4 after 1X dilution; 0.1% Tween-20) with primary antibodies (diluted 1:1000) to p-AKT<sup>ser473</sup> (CST 4060), AKT (CST 4685), p-S6RP<sup>ser240/244</sup> (CST 2215), S6RP (CST 2217), p-ERK1/2<sup>thr202/tyr204</sup> (CST 4370), ERK1/2 (ab17942), RICTOR (CST 2114) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, SC-51907). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany) was diluted 1:5000. Bound antibodies were visualized by Fusion Fx7 (Fisher Bioblock Scientific, Waltham, MA, USA) using Immobilon<sup>TM</sup> Western (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), an enhanced chemiluminescence detection kit. The resulting bands were analyzed and quantified by ImageJ<sup>®</sup> 1.49 g software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). GAPDH served as a loading control. Each membrane was reused twice after stripping in glycine buffer (6.6 mol/L, pH 2) at 56°C for 20 min. Each experiment was repeated at least 2 times.

### Ribonucleic acid interference (RNAi)

For transfections,  $1 \times 10^5$  LMS cells were seeded in duplicate into 6-well plates and grown to 60–70% confluency. Cells were transfected and incubated for 72 hours with 80 pmol RICTOR RNAi (AM16708-261571, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using 6  $\mu$ L Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in a total volume of 300  $\mu$ L growth medium containing 10% FBS. Then, protein samples were collected for western blotting. Each RNAi experiment was performed at least 2 times. Negative control (AM4613, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using an RNAi that was not homologous to any known genes was used to control against nonspecific effects of the oligonucleotides.

### Drug synergy assays

LMS cells were treated with single drugs or a combination of two drugs for 72 hours. To confirm the synergistic effects between two drugs, a diagonal constant ratio combination design was implemented according to the Chou and Talalay proposition [22]. Cells were incubated with a 2-fold serial dilution with several concentrations above and below the  $IC_{50}$  values of both drugs at a constant ratio. After the incubation period, MTT was immediately added to the wells, and the absorbance was monitored using the Flexstation 3 Plate reader. The analysis of the synergy assay was conducted by the isobologram and combination index (CI) methods derived from the median-effect principle of Chou and Talalay. The combination effects of the two agents can be summarized as follows: combination index (CI) < 1 (under the curve), CI = 1 (near the curve), and CI > 1 (above the curve)

indicates synergistic, additive and antagonistic effects, respectively. Synergy experiments were repeated at least three times.

### Animal studies

All animal experiments under project license DIR1384 were performed with the approval of the institutional animal use and care committee. LMS cells ( $5 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ L) were injected subcutaneously into the right flank of Ragy2C<sup>-/-</sup> mice ( $n = 10$ ). Only the IB136 LMS cell line was able to grow in mice. Once palpable, the tumor volumes were calculated using the following formula: length  $\times$  width<sup>2</sup> / 2. After tumors reached approximately 100 mm<sup>3</sup> in average size, animals were treated by oral gavage (100  $\mu$ L). BEZ235 and GSK1120212 were prepared by dissolving in 1 volume of NMP (1-methyl-2-pyrrolidone) in a 100°C water bath followed by the addition of 9 volumes of PEG300 (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). GDC-0941 and everolimus were dissolved in water with 0.5% methylcellulose and 0.5% Tween 80 (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). To study of the effect of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors on LMS tumor growth, mice were randomly assigned to receive 40 mg/kg BEZ235, 50 mg/kg GDC-0941, 5 mg/kg everolimus or the corresponding vehicle (NMP/PEG300 or methylcellulose). To study the anti-tumor effect of BEZ235 and GSK1120212 alone or in combination, mice were randomly treated with vehicle, 10 mg/kg BEZ235, 0.5 mg/kg GSK1120212 or a combination of both drugs. Drug concentrations were not the same as the previous *in vitro* experiments due to the strong synergy observed with the drug combination. Three weeks after drug administration, mice were euthanized, and tumors were excised. Tumor progression was analyzed with GraphPad Prism software and Kaplan-Meier curve analysis was used to compare individual tumor doubling rates. Log-rank (Mantel-Cox) tests were used to compare Kaplan-Meier curves with the program GraphPad Prism and *p*-values of 0.05 and below were considered significant.

### Immunohistochemistry

To perform immunohistochemistry on LMS cell line pellets, cells were grown to confluency in 6-well plates. Then, the cells were harvested, centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes, incubated overnight in 10% paraformaldehyde and placed carefully into a cassette lined with biopsy filter paper. Next, the cell pellets were embedded in paraffin. Finally, sections of patient tumor samples and corresponding LMS cell line pellets were incubated with either anti-p-S6RP<sup>Ser240/244</sup> (CST 5364; 1:100) or anti-PTEN (CST 9559; 1:100). To confirm a negative labeling in tissues, we used endothelial cells as a positive control. For the *in vivo* study, three weeks after treatment with drugs or vehicles, mice were euthanized, and tumors

were harvested in 10% paraformaldehyde. Paraffin sections were incubated with anti-Ki-67 (Ventana 790-4286; 1:100) and anti-p-S6RP<sup>Ser240/244</sup>. Tissue imaging was conducted with an Olympus CKX41 ( $\times 100$ ) using image capture cellSens Entry software version 1.14 for Windows (Olympus, Rungis, France). The immunoreactivity signal corresponding to the target expression level was estimated by a pathologist on the basis of the percentage of positively stained cells.

### CONFLICTS OF INTEREST

The authors disclose no potential conflicts of interest.

### FINANCIAL SUPPORT

This study was supported by the Integrated Cancer Research Site of Bordeaux (SIRIC BRIO).

### REFERENCES

1. Fletcher C, Bridge J, Hogendoorn P, Mertens F eds. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of soft Tissue and bone. 4th edn. Lyon: IARC Press; 2013.
2. Clark MA, Fisher C, Judson I, Thomas JM. Soft-tissue sarcomas in adults. *N Engl J Med*. 2005; 353:701–11. doi: 10.1056/NEJMra041866.
3. Woll PJ, Reichardt P, Le Cesne A, Bonvalot S, Azzarelli A, Hoekstra HJ, Leahy M, Van Coevorden F, Verweij J, Hogendoorn PCW, Ouali M, Marreaud S, Bramwell VHC, et al. Adjuvant chemotherapy with doxorubicin, ifosfamide, and lenograstim for resected soft-tissue sarcoma (EORTC 62931): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2012; 13:1045–54. doi: 10.1016/S1473-2045(12)70346-7.
4. Gladly RA, Qin L-X, Moraco N, Agaram NP, Brennan MF, Singer S. Predictors of Survival and Recurrence in Primary Leiomyosarcoma. *Ann Surg Oncol*. 2013; 20:1851–7. doi: 10.1245/s10434-013-2876-y.
5. Agaram NP, Zhang L, LeLoarer F, Silk T, Sung Y-S, Scott SN, Kuk D, Qin L-X, Berger MF, Antonescu CR, Singer S. Targeted exome sequencing profiles genetic alterations in leiomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016; 55:124–30. doi: 10.1002/gcc.22318.
6. Yang J, Du X, Chen K, Ylipää A, Lazar AJF, Trent J, Lev D, Pollock R, Hao X, Hunt K, Zhang W. Genetic aberrations in soft tissue leiomyosarcoma. *Cancer Lett*. 2009; 275:1–8. doi: 10.1016/j.canlet.2008.06.013.
7. Gibault L, Ferreira C, Pérot G, Audebourg A, Chibon F, Bonnin S, Lagarde P, Vacher-Lavenu M-C, Terrier P, Coindre J-M, Aurias A. From PTEN loss of expression to RICTOR role in smooth muscle differentiation: complex involvement of the mTOR pathway in leiomyosarcomas



- and pleomorphic sarcomas. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2012; 25:197–211. doi: 10.1038/modpathol.2011.163.
8. Italiano A, Lagarde P, Brulard C, Terrier P, Laë M, Marques B, Ranchere-Vince D, Michels JJ, Trassard M, Cioffi A, Piperno-Neumann S, Chevreau C, Blay JY, et al. Genetic profiling identifies two classes of soft-tissue leiomyosarcomas with distinct clinical characteristics. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013; 19:1190–6. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2970.
  9. Hu J, Rao UNM, Jasani S, Khanna V, Yaw K, Surti U. Loss of DNA copy number of 10q is associated with aggressive behavior of leiomyosarcomas: a comparative genomic hybridization study. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005; 161:20–7. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2005.01.011.
  10. Hernando E, Charytonowicz E, Dudas ME, Menendez S, Matushansky I, Mills J, Socci ND, Behrendt N, Ma L, Maki RG, Pandolfi PP, Cordon-Cardo C. The AKT- mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas. *Nat Med.* 2007; 13:748–53. doi: 10.1038/nm1560.
  11. Forscher C, Mita M, Figlin R. Targeted therapy for sarcomas. *Biol Targets Ther.* 2014; 8:91–105. doi: 10.2147/BTT.S26555.
  12. Italiano A, Kind M, Stoeckle E, Jones N, Coindre J-M, Bui B. Temsirolimus in advanced leiomyosarcomas: patterns of response and correlation with the activation of the mammalian target of rapamycin pathway. *Anticancer Drugs.* 2011; 22:463–7. doi: 10.1097/CAD.0b013e3283442074.
  13. Iwenofu OH, Lackman RD, Staddon AP, Goodwin DG, Haupt HM, Brooks JSJ. Phospho-S6 ribosomal protein: a potential new predictive sarcoma marker for targeted mTOR therapy. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2008; 21:231–7. doi: 10.1038/modpathol.3800995.
  14. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, Kozma SC, Papa A, Nardella C, Cantley LC, et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest.* 2008; 118:3065–74. doi: 10.1172/JCI34739.
  15. O'Reilly KE, Rojo F, She Q-B, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res.* 2006; 66:1500–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2925.
  16. Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene.* 2008; 27:5527–41. doi: 10.1038/onc.2008.247.
  17. Demetri GD, Chawla SP, Ray-Coquard I, Le Cesne A, Staddon AP, Milhem MM, Penel N, Riedel RF, Bui-Nguyen B, Cranmer LD, Reichardt P, Bompas E, Alcindor T, et al. Results of an international randomized phase III trial of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus versus placebo to control metastatic sarcomas in patients after benefit from prior chemotherapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2013; 31:2485–92. doi: 10.1200/JCO.2012.45.5766.
  18. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 2006; 7:606–19. doi: 10.1038/nrg1879.
  19. Julien L-A, Carriere A, Moreau J, Roux PP. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol.* 2010; 30:908–21. doi: 10.1128/MCB.00601-09.
  20. Babichev Y, Kabaroff L, Datti A, Uehling D, Isaac M, Al-Awar R, Prakesch M, Sun RX, Boutros PC, Venier R, Dickson BC, Gladly RA. PI3K/AKT/mTOR inhibition in combination with doxorubicin is an effective therapy for leiomyosarcoma. *J Transl Med.* 2016; 14: 67. doi: 10.1186/s12967-016-0814-z.
  21. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K Pathway As Drug Target in Human Cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28:1075–83. doi: 10.1200/JCO.2009.25.3641.
  22. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984; 22:27–55.
  23. Weigelt B, Downward J. Genomic Determinants of PI3K Pathway Inhibitor Response in Cancer. *Front Oncol.* 2012; 2: 109. doi: 10.3389/fonc.2012.00109.
  24. Maira S-M, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Chène P, De Pover A, Schoemaker K, Fabbro D, Gabriel D, Simonen M, et al. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/ mammalian target of rapamycin inhibitor with potent *in vivo* antitumor activity. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7:1851–63. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0017.
  25. Dienstmann R, Rodon J, Serra V, Tabernero J. Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Mol Cancer Ther.* 2014; 13:1021–31. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0639.
  26. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci.* 2011; 36:320–8. doi: 10.1016/j.tibs.2011.03.006.
  27. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell.* 2007; 12:9–22. doi: 10.1016/j.ccr.2007.05.008.
  28. Sparks CA, Guertin DA. Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy. *Oncogene.* 2010; 29:3733–44. doi: 10.1038/onc.2010.139.
  29. Soares HP, Ming M, Mellon M, Young SH, Han L, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. Dual PI3K/mTOR Inhibitors Induce Rapid Overactivation of the MEK/ERK Pathway in Human Pancreatic Cancer Cells through Suppression of mTORC2. *Mol Cancer Ther.* 2015; 14:1014–23. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0669.
  30. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC,

- Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med*. 2002; 347:472–80. doi: 10.1056/NEJMoa020461.
31. Rutkowski P, Van Glabbeke M, Rankin CJ, Ruka W, Rubin BP, Debiec-Rychter M, Lazar A, Gelderblom H, Sciot R, Lopez-Terrada D, Hohenberger P, van Oosterom AT, Schuetze SM, et al. Imatinib mesylate in advanced dermatofibrosarcoma protuberans: pooled analysis of two phase II clinical trials. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010; 28:1772–9. doi: 10.1200/JCO.2009.25.7899.
32. Italiano A, Delcambre C, Hostein I, Cazeau AL, Marty M, Avril A, Coindre JM, Bui B. Treatment with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with malignant PEComa. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2010; 21:1135–7. doi: 10.1093/annonc/mdq044.
33. Italiano A, Keilhack H, Toulmonde M, Coindre JM, Michot JM, Massard C, Ottesen L, Reyderman L, Blakemore S, Kraljevic S, Thomson B, McDonald A, Ho P, et al. A phase I study of EPZ-6438 (E7438), an Enhancer of Zeste-Homolog 2 (EZH2) inhibitor: Preliminary activity in INI1-negative tumors. *Eur J Cancer*. 2015; 51:S54-S55.
34. Lagarde P, Brulard C, Péro G, Mauduit O, Delespaul L, Neuville A, Stoeckle E, Le Guellec S, Rochaix P, Coindre JM, Chibon F. Stable Instability of Sarcoma Cell Lines Genome Despite Intra-Tumoral Heterogeneity: A Genomic and Transcriptomic Study of Sarcoma Cell Lines. Available 2016 from.
35. Harlow E, Lane D. Lysing tissue-culture cells for immunoprecipitation. *CSH Protoc*. 2006; 2006. doi: 10.1101/pdb.prot4531.

## **Partie 2 - Résistance secondaire au ciblage de la voie PI3K/mTOR**

## A. Résumé de l'article

Nos premiers résultats ont confirmé l'intérêt d'un ciblage thérapeutique de PI3K/mTOR dans les léiomyosarcomes. De nombreux inhibiteurs double cible de PI3K et mTOR sont en cours de développement dans divers types de tumeurs solides (voir Introduction, Chapitre 4, Les inhibiteurs à double cible). Toutefois, comme pour toutes les thérapies ciblées, des tumeurs initialement sensibles vont développer des résistances secondaires qui se traduisent sur le plan clinique par une progression de la maladie. Plusieurs travaux ont décrit des mécanismes de résistance secondaire aux inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR dans les tumeurs épithéliales (voir Introduction, Chapitre 4, La résistance aux inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR). Il n'existe en revanche aucune donnée dans la littérature concernant les sarcomes.

Afin d'élucider les mécanismes de résistance secondaire à une inhibition duale de PI3K/mTOR dans les léiomyosarcomes, nous avons généré des modèles de résistance *in vitro* en exposant les trois lignées cellulaires de LMS (IB112, IB134 et IB136) à des doses de concentrations croissantes de BEZ235 durant 48 semaines. Les cellules résistantes présentaient une augmentation de leur IC<sub>50</sub> (concentration de la drogue inhibant 50 % de la prolifération des cellules) d'un facteur 10 comparé aux lignées parentales. Nous avons également obtenu un modèle de résistance *in vivo* en injectant les cellules résistantes issue de la lignée cellulaire IB136 en sous-cutanée chez des souris immunodéficientes.

Pour identifier les mécanismes de résistance secondaire au BEZ235, nous avons réalisé le séquençage du transcriptome de trois tumeurs issues de la lignée IB136 (dites « sensibles ») et trois tumeurs issues des cellules résistantes (dites « résistantes »). Cela nous a permis de mettre en évidence plusieurs gènes différentiellement exprimés dont 583 qui sont surexprimés et 402 qui sont sous-exprimés quand on compare les tumeurs « résistantes » aux tumeurs « sensibles ». Parmi cette population de gènes surexprimés dans les tumeurs « résistantes », nous avons identifié plusieurs gènes jouant un rôle dans l'auto-renouvellement et la maintenance des cellules souches suggérant l'émergence d'une population cellulaire dite « souche » comme mécanisme de résistance dans nos modèles *in vitro* et *in vivo*. Pour valider ces résultats, nous avons analysé l'activité de l'ALDH (*aldehyde deshydrogenase*), un marqueur d'activité des cellules souches (Storrs et al., 1999), par cytométrie en flux. Nous avons alors constaté une hausse de l'activité enzymatique de l'ALDH dans nos trois lignées cellulaires résistantes au BEZ235 par comparaison aux lignées parentales. Par ailleurs, un tri cellulaire par cytométrie en flux basé sur l'activité de l'ALDH, nous a permis de démontrer d'une part la capacité de cette population à résister au BEZ235 et d'autre part leur capacité à

former des sphères en culture (une autre caractéristique des cellules souches (Lee et al., 2015a)) dans un milieu favorisant le maintien des propriétés « souches ». Pour valider ces observations précliniques, nous avons eu accès à du matériel tumoral provenant de patients atteints de sarcome et ayant développé une résistance secondaire au BYL719, un inhibiteur de la sous-unité PI3K $\alpha$ . Une étude du transcriptome de ces tumeurs a révélé également un enrichissement d'une population cellulaire aux caractéristiques « souches ».

Le complexe PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) et plus particulièrement sa sous-unité EZH2 (*Enhancer of Zeste Homolog 2*) est associé au développement embryonnaire et à la maintenance des cellules souches (O'Carroll et al., 2001). Nous avons alors émis l'hypothèse qu'un ciblage thérapeutique de ce complexe pourrait lever la résistance au BEZ235. Lorsque le complexe PRC2 est activé, il catalyse la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27Me3). De manière intéressante, nous avons observé un nombre important de cellules marquées H3K27Me3 par immunohistochimie dans les tumeurs résistantes de patients comparées aux tumeurs avant traitement, ce qui renforcerait notre hypothèse. Nous avons alors testé l'utilisation d'un inhibiteur d'EZH2 (EPZ011989) en combinaison avec le BEZ235 dans nos modèles de résistance *in vitro* et *in vivo*. Nos résultats ont montré que l'inhibition de l'activité du complexe PRC2 pouvait partiellement restaurer une sensibilité au BEZ235 des cellules résistantes de léiomyosarcome. En effet, *in vitro*, nous avons observé qu'une perte de l'activité ALDH après traitement à l'EPZ011989 est corrélée à une diminution de cellules viables en présence de BEZ235. *In vivo*, nous avons constaté la restauration de l'activité antitumorale du BEZ235.

Ces résultats cliniques et précliniques démontrent l'apparition d'une population dite « souche » pouvant être responsable de la résistance aux inhibiteurs de la voie de signalisation PI3K/mTOR dans les sarcomes des tissus mous. Outre les enjeux thérapeutiques de la compréhension des mécanismes de résistance au BEZ235, nous avons développé des modèles uniques de résistance aux inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR dans les léiomyosarcomes. Par ailleurs, grâce à notre étude, nous avons montré que l'ALDH pouvait être utilisé comme marqueur de cellules souches dans les léiomyosarcomes.

**B. Article : “Secondary resistance to PI3K/mTOR inhibition is linked to cancer stem cells and is circumvented by EZH2 inhibition.”**

Benjamin Fourneaux<sup>1,2</sup>, Aurélien Bourdon<sup>2</sup>, Carlo Lucchesi<sup>2</sup>, François Le Loarer<sup>3</sup>, Audrey Laroche-Clary<sup>1,2</sup>, Antoine Italiano<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Université de Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>2</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1218, Institut Bergonié, Bordeaux, France

<sup>3</sup> Department of Medical Oncology, Institut Bergonié, Bordeaux, France

Science Translational Medicine, 2017. (Soumis pour publication) \*

\* Résultats présentés en partie au 108th AACR Annual Meeting, Washington DC, 2017

## Abstract

The targeting of dysregulated signaling pathways is an attractive therapeutic strategy for solid tumors, but drug resistance is common. The PI3K/AKT/mTOR pathway plays a crucial role in the development of leiomyosarcomas (LMSs). We investigated the mechanisms of secondary resistance to PI3K/mTOR inhibition in LMS. Using LMS cells resistant to the dual PI3K/mTOR small-molecule inhibitor BEZ235, we identified that secondary resistance was associated with the expansion of a subpopulation of cells with stem-cell-like characteristics, including enhanced ALDH1A2 activity. EZH2 inhibition, a catalytic component of polycomb repressive complex 2 (PRC2), which plays a critical role in stem cell maintenance, restored sensitivity to BEZ235 in drug-resistant cells in culture and induced tumor regression in drug-resistant xenografts in mice. By analyzing tumor samples from three patients who showed secondary resistance after treatment with a PI3K $\alpha$  inhibitor, we found a significant increase in the level of H3K27Me3, the substrate of EZH2, in the samples obtained at resistance compared with pretreatment samples. Additionally, we identified a significant up-regulation of several stem cell genes. Altogether, our findings suggest that treatment with combined PI3K/mTOR and EZH2 inhibitors may improve therapeutic outcomes in patients with LMSs.

## Introduction

Leiomyosarcomas (LMSs) are one of the most frequent histological subtypes of soft-tissue sarcomas (15-20%) with well-defined characteristics. It is classically considered that LMSs are malignant tumors composed of cells that show distinct smooth muscle differentiation (1). The standard multimodal treatment strategies are surgery, radiation and conventional chemotherapy, with an aggressive approach taken against high-grade tumors (2). The prognosis for LMSs is poor, with up to 40% of patients experiencing metastatic relapse despite optimal locoregional treatment (3, 4). Due to the insufficient effectiveness of the current treatment options, novel therapeutics involving target-specific drugs are urgently needed.

LMSs belong to the class of sarcomas with complex genomic alterations characterized by non-recurrent structural and copy number alterations (5, 6). In 40-50% of LMS cases, cytogenetic studies have shown a loss of chromosome 10q encompassing PTEN (phosphatase and tensin homolog), a tumor suppressor gene and negative regulator of phosphoinositide-3-kinase (PI3K) (7–9). Moreover, conditional knock-out of PTEN from the smooth muscles of mice predisposes them to development of LMSs in various organs (10). In these studies, mTOR inhibition was associated with significant anti-tumor activity (11). These data have recently been confirmed in the clinical setting by a pilot study of advanced LMS patients with who benefited significantly from treatment with temsirolimus (12). However, several studies have shown that mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) inhibition by rapamycin and its analogs is associated with a loss of negative feedback control of the MAPK pathway (13) and PI3K/mTOR pathway in solid tumors (14, 15). These findings may explain the transient benefits observed with mTOR inhibitors in a clinical setting and further underscore the need for more potent strategies to target this pathway (16).

PI3K and mTOR belong to the PI3K-related kinase superfamily and share structural domains. Consequently, certain inhibitory compounds target both kinases (17). Dual inhibitors of PI3K and mTOR target the active sites of both holoenzymes to inhibit the pathway both upstream and downstream of AKT, thus avoiding the problem of AKT activation following abolition of the mTORC1-S6K-IRS-1 or S6K-mTORC2-AKT negative feedback loops (18). Our group and others have reported that dual PI3K and mTOR inhibition is associated with strong anti-tumor activity in LMS, which was significantly greater than that of either mTOR inhibition or PI3K inhibition alone (19–22).

While several dual PI3K/mTOR inhibitors are under development, this class of drugs suffers from the same major limitation associated with other targeted therapies and traditional



chemotherapy drugs in a metastatic disease setting; that is, the duration of any observed clinical benefit is limited, owing to the relatively rapid acquisition of drug resistance. Therefore, identifying specific molecular mechanisms of resistance is crucial to define new strategies to overcome or prevent the development of resistance to PI3K/mTOR inhibitors in the clinical setting.

Here, we report the first study assessing the mechanisms of secondary resistance to dual PI3K/mTOR inhibition in human tumor models.

## Results

### Generating dual PI3K/mTOR inhibitor resistant LMS cells in vitro and in vivo

In order to generate drug resistant leiomyosarcoma tumor cells, we escalated drug concentrations in LMS cell cultures. Three LMS cell lines were exposed to BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, using doses that were increased in a stepwise manner, and surviving cells were selected until normal cell growth resumed. Thus, we independently established three BEZ235-resistant LMS cell lines (resIB112, resIB134 and resIB136), which exhibited BEZ235 IC50 values that were >8-fold higher than the parental cell line (Fig. 1A). Cells required approximately 48 weeks in culture to achieve resistance. As indicated in Fig. 1B, secondary resistant cells were significantly more resistant than parental cells to BEZ235-induced apoptosis. No cross-resistance with other anti-cancer agents approved for the management of sarcoma patients (doxorubicin, gemcitabine) was observed (Fig. S1).

These in vitro findings prompted us to examine whether these cells were drug resistant in an in vivo setting. Thus, IB136 and resIB136 xenografts were established and grew to a size of 100 mm<sup>3</sup>, after which mice were treated orally with either vehicle or BEZ235 5 days a week for 3 weeks. Our results showed that 40 mg/kg of BEZ235 treatment potently inhibited tumor growth of IB136-derived xenografts (55% tumor inhibition,  $p < 0.05$ ), while tumor growth of resIB136-derived xenografts was strongly similar to the vehicle-treated group (Fig. 1C). No apparent toxicity events were observed in the drug-treated animals. There were no significant changes in animal weight (data not shown). The number of tumor cells positive for Ki-67, a cell proliferation marker, and p-S6RPs240/244, a protein indicating activity of the PI3K/mTOR pathway, were substantially lower in IB136 and resIB136 xenografts treated with BEZ235 compared with control tumors (Fig. 1D).

### Cancer stem cell (CSC) markers were up-regulated in LMS tumors with acquired BEZ235 resistance

To identify the mechanisms of secondary resistance to BEZ235, we performed whole-transcriptome sequencing (RNAseq) of three independent parental and resistant tumors. We identified 985 genes that were differentially expressed between IB136-derived parental and resistant tumor xenografts, among which 583 genes were up-regulated, and 402 genes were down-regulated (with a 2X or more fold-change and an adjusted  $p$ -value  $< 0.01$ ). Features of differentially expressed genes in resIB136 tumors were summarized (up-regulated genes in Table S1 and down-regulated genes in Table S2). We then analyzed these genes using Ingenuity

Pathway Analysis software (IPA®, Qiagen Redwood City). The results showed that these genes were mainly enriched in proliferative, growth and embryonic development networks. Strikingly, in the resistant IB136 tumors, we found a significant up-regulation of several genes known to be expressed in cancer stem cells (Table 1). Among them, NCAM1 was the most strongly up-regulated with a fold-change of 372.15. Moreover, up-regulation of ALDH1A2 (fold-change of 10.40), KLF5 (fold-change of 6.73) and SOX2 (fold-change of 2.5) suggested that secondary resistance to a dual PI3K/mTOR inhibitor could be associated with the emergence of a CSC-like subpopulation. Indeed, these markers have been reported as being involved in the self-renewal and self-protection of cancer stem cells (23–26). To confirm our hypothesis at the protein level, we examined the immunohistochemical expression of the stem cell marker SOX2 in the parental and secondary resistant tumors and found significantly higher expression in the resistant tumors (Fig. 2).

### **LMS cells with ALDH activity have tumorigenic and resistant CSC properties**

Then, to examine whether secondary resistant LMS cell lines contain a CSC-like subpopulation compared to parental cell lines, we performed the Aldefluor assay in parental and resistant cell lines. Several lines of evidence showed that enhanced aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity, measurable by the Aldefluor assay, is a hallmark of cancer stem cells (27, 28). Flow cytometry analyses revealed that ALDH activity was significantly higher in resistant cell lines compared to parental lines (Fig. 3A). These results indicated that the three BEZ235-resistant cell lines contain a subset of cells with high ALDH enzymatic activity.

CSCs possess an increased capacity for tumorigenicity and resistance to anti-cancer drugs. We hypothesized that ALDH<sup>high</sup> cells are CSCs. To further address the characteristics of these high-ALDH LMS cells and their role in resistance to dual PI3K/mTOR inhibition, we isolated ALDH<sup>low</sup> and ALDH<sup>high</sup> subpopulations from the resistant LMS cell lines by using FACS. We then compared their respective viability after 72 hours of treatment with 5  $\mu$ M BEZ235 (Fig. 3B). The ALDH<sup>high</sup> subpopulation was significantly more refractory to chemotherapy than was the ALDH<sup>low</sup> subpopulation in all the three cell lines. To evaluate the stem cell properties of the LMS cells according to the level of ALDH expression, we submitted ALDH<sup>low</sup> and ALDH<sup>high</sup> subpopulations to a tumorsphere assay. In the three resistant leiomyosarcoma cell lines, ALDH<sup>high</sup> cells formed significantly more tumorspheres after 15 days of in vitro culture than their respective negative counterparts (Fig. 3C). Moreover, treatment of BEZ235 at IC<sub>50</sub> did not alter the capacity of ALDH<sup>high</sup> cells to form spheres. A self-renewal assay with cells taken from the tumorspheres confirmed that the ALDH<sup>high</sup>

subpopulation was comprised of tumorigenic CSCs (Fig. 3D). Altogether, these results indicate that ALDH is useful for the detection and isolation of CSCs with tumorigenic and resistant properties in leiomyosarcoma.

Finally, by analyzing several cell lines derived from epithelial tumors, we found a similar expansion of ALDH<sup>high</sup> cells after treatment with high doses of BEZ235, whereas the use of cytotoxic drugs had no impact suggesting that this mechanism is not limited to sarcomas and is specific to the resistance to PI3K/mTOR inhibition (Fig. S2).

### **Clinical validation of the presence of a CSC-like subpopulation as a potential resistance mechanism to a PI3K/mTOR pathway inhibitor**

To confirm our *in vitro* and *in vivo* observations, we decided to analyze tumor samples from three sarcoma patients treated with a PI3K $\alpha$  inhibitor where sample material was available from prior to treatment onset and at occurrence of secondary resistance (NCT01735968). We were able to perform whole-transcriptome sequencing (RNAseq) of paired primary/secondary resistant tumor samples from one of these three patients. Then, 1,110 genes were differentially expressed in the resistant tumor, among which 991 genes were up-regulated and 119 genes were down-regulated (with a 4X or greater fold-change and an adjusted p-value < 0.01). Features of differentially expressed genes in this clinical sample were summarized (up-regulated genes in Table S3 and down-regulated genes in Table S4). We then applied the same analysis methods as described previously. Strikingly, the results once again showed up-regulation of multiple cancer stem cell markers in the resistant tumor sample. Of these markers, POU5F1 was the most strongly up-regulated with a fold-change of 38.75 (Table 2). POU5F1, also known as Oct-3/4, is one of the most important proteins associated with the pluripotent properties of stem cells and is an essential factor controlling the early stages of mammalian embryogenesis (29, 30).

Since the polycomb repressive complex 2 (PRC2), including EZH2, has been shown to play a crucial role in stem cell maintenance (31), we decided to investigate whether secondary resistance to PI3K $\alpha$  inhibition in these patients was correlated with PRC2 activity. When PRC2 is activated, it catalyzes the trimethylation of lysine 27 of histone H3 (H3K27Me3). By using IHC, we found a significantly higher level of H3K27Me3 in resistant tumors compared with primitive tumors (Fig. 4).

**Pretreatment of resistant LMS cells with an EZH2 inhibitor significantly re-sensitizes cells to BEZ235 in vitro and in vivo**

Therefore, we wondered whether blocking PRC2 activity with an EZH2 inhibitor could restore sensitivity to dual PI3K/mTOR inhibition. To this end, we pretreated BEZ235-resistant cells with EPZ011989, a potent orally available EZH2 inhibitor, for one week followed by treatment with BEZ235 for 72 hours. Pre-treatment of resistant cells with EPZ011989 restored sensitivity to BEZ235, generating IC<sub>50</sub> values that were similar to the parental cell lines (Fig. 5A). Moreover, flow cytometric results revealed that ALDH activity was decreased in resistant cells pretreated with EPZ011989 compared to untreated resistant cells suggesting that EZH2 inhibition activity induced a loss or at least a decrease, in the CSC-like subpopulation (Fig. 5B). As shown in the representative immunocytochemistry images, resistant IB112, IB134 and IB136 cell lines pretreated with EPZ011989 showed a marked decrease in the number of H3K27Me<sub>3</sub>-positive cells compared with the control (Fig. 5C).

Moreover, we tested whether PRC2 blockade could re-sensitize cells to dual PI3K/mTOR inhibition in vivo. resIB136 xenografts were established and allowed to grow to a size of 100 mm<sup>3</sup>. Mice were randomly pretreated with either vehicle or 125 mg/kg of EPZ011989 BID for 2 weeks. Then, in the EPZ011989-pretreated group, mice were randomly treated for 3 weeks with 40 mg/kg of BEZ235 or 125 mg/kg of EPZ011989 BID. The EPZ011989 pretreatment plus BEZ235 group showed an antitumor effect with a significant ( $p < 0.05$ ) reduction of tumor growth (average tumor volume at endpoint,  $216.5 \pm 50.3$  mm<sup>3</sup>) compared with either drug alone ( $321.8 \pm 51.75$  mm<sup>3</sup> for BEZ235 and  $308.9 \pm 55.02$  mm<sup>3</sup> for EPZ011989) or vehicle ( $355.9 \pm 73.83$  mm<sup>3</sup>) as shown in Fig. 6A. Additionally, the survival data of mice (from the first day of the experiment until the day when the tumor size doubled) showed that the combination treatment significantly ( $p < 0.05$ ) slowed the rate of tumor growth (24.65 days for median survival) compared to the vehicle (18.76 days) and the individual drug (15.12 days for BEZ235 and 16.89 days for EPZ011989) treatment groups (Fig. 6B). No apparent toxicity events were observed in the drug-treated animals. There were no significant changes in animal weight (data not shown). Further immunohistochemical analyses showed that the number of tumor cells positive for p-S6RPs240/244 was substantially lower in tumors treated with BEZ235. None of the tumors pretreated with EPZ011989 displayed SOX2- or H3K27Me<sub>3</sub>-positive cells (Fig. 6C).

## Discussion

Recently, we have shown that dual PI3K/mTOR inhibition by treatment with BEZ235 was associated with strong antitumor activity in leiomyosarcoma, which was significantly higher than that seen with either PI3K or mTOR inhibition alone (22). These findings will lead to a clinical investigation of dual PI3K/mTOR targeting in this setting. However, as for other targeted therapies, several unanswered questions remain regarding the role of PI3K inhibition in cancer treatment. The most important of these roles is related to the identification of potential mechanisms of PI3K inhibitor resistance and how these might be overcome. Indeed, the complexity of the PI3K/mTOR pathway, which involves negative feedback loops and extensive crosstalk with other signaling pathways, provides ample opportunities for resistance development (32). A greater understanding of resistance mechanisms will enable the rational design of combination regimens and sequential treatment algorithms to improve clinical outcomes.

In the present study, we sought to identify mechanisms of resistance to targeted PI3K/mTOR inhibition in LMS models. To this end, we used our recently characterized LMS cell lines, xenografts models and patient tumor samples. Although each model contains inherent limitations, we have gained appreciable insight into the potential underlying mechanisms of resistance that could be anticipated in response to targeted inhibition of the PI3K/mTOR axis in this disease segment. The models that we used acquired resistance *in vitro* after 48 weeks of increasing drug pressure. Importantly, we were able to confirm our *in vitro* resistance models *in vivo*, and the resistance phenotype observed was specific to dual PI3K/mTOR inhibition given the lack of cross-resistance with other commonly used LMS drugs such as doxorubicin or gemcitabine.

In our model, secondary resistance was associated with the expansion of a subpopulation of cells with stem-like characteristics, including enhanced ALDH1A2 activity, a well-characterized marker of stem cells and poor prognosis in several cancers (33–36). Importantly, we were able to demonstrate the stem-cell-like nature of this subpopulation and its involvement in resistance by several methods: (i) genomic profiling of parental and resistant tumors using RNAseq paired with gene set-enrichment analysis which to identify up-regulation of several stem cell genes such as ALDH1A2, NCAM1, KLF5, CXCR4 and SOX2; (ii) isolation of ALDH<sup>high</sup> cell subpopulations by using the fluorescent reagent (ALDEFLUOR®, Stem Cell Technologies, Durham, USA); (iii) assessment of the ability of the ALDH<sup>High</sup> subpopulation to form spherical colonies when grown under non-adherent conditions; (iv) assessment of the

ability of ALDH<sup>high</sup> cells to self-renew; and (v) assessment of the toxicity of dual PI3K/mTOR inhibition on ALDH<sup>low</sup> and ALDH<sup>high</sup> cells.

Previous studies suggested that such a stem-cell like population may be inherently resistant to PI3K/mTOR inhibition (37, 38). Interestingly, we found a similar expansion in ALDH<sup>high</sup> cells in several cell lines derived from epithelial tumors after treatment with high doses of BEZ235, whereas the use cytotoxic drugs in these cell lines had no impact, suggesting the specificity of this mechanism of resistance.

Several studies have shown that epigenetic modifications, including those induced by polycomb group (PcG) proteins, play a crucial role in CSC maintenance (39, 40). Indeed, epigenetic modification by PcG proteins is critical for maintaining stem-cell-like characteristics in adult stem cells and in embryonic stem cells (41). As a key protein in the PcG family, EZH2 is the catalytic subunit of the multi-protein histone methyl transferase complex known as PRC2. The core catalytic complex is composed of four different proteins: EZH2, EED, SUZ12, and RBAP48. PRC2 catalyzes the mono-, di-, and trimethylation of H3K27 (42). The trimethylated form of H3K27Me<sub>3</sub> is associated with the repression of genes important for differentiation. SWI/SNF is another multi-protein complex involved in chromatin remodeling. It antagonizes PRC2 activity in regulating self-renewal and differentiation of cells (43). In stem or progenitor cells, EZH2 activity is high and the expression of PRC2 target genes is therefore repressed. When EZH2 activity is down-regulated, PRC2 target gene expression is increased through augmented SWI/SNF activity, and cells can differentiate and become quiescent. Remarkably, we have shown that EZH2 inhibition induced a significant decrease in ALDH activity in resistant cells and was able to restore the anti-tumor effect of BEZ235 *in vitro* and *in vivo*.

Importantly, we confirmed the clinical relevance of our findings by analyzing tumor samples from three patients who showed secondary resistance after treatment with a PI3K $\alpha$  inhibitor. We found a significant increase in the level of H3K27Me<sub>3</sub>, the substrate of EZH2, in the samples obtained at resistance in comparison with pretreatment samples as well as a significant up-regulation of several stem cell genes.

Altogether, our results provide insights into the epigenetic resistance that may arise in human tumors exposed to PI3K/mTOR inhibition and consolidate the path toward novel treatment options combining inhibitors of oncogenic signaling pathways and epigenetic modulators.

## Materials and Methods

### Cell culture

Leiomyosarcoma cell lines were obtained and established as previously described (22). The LMS cell lines IB112 and IB136 and the uterine LMS cell line IB134 were cultured in RPMI 1640 medium, GlutaMAX™ Supplement (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 0.2% Normocin (InvivoGen, Toulouse, France) at 37°C in an environment containing 5% CO<sub>2</sub>. All other cell lines (DU145, HCT116, MDA-MB-231, MDA-MB-453, SUM and SKBR3) were purchased from ATCC. DU145 and HCT116 were cultured in RPMI 1640 medium. MDA-MB-231, MDA-MB-453, SUM and SKBR3 cell lines were cultured in complete Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Cells were routinely passaged every 2 to 3 days. The cell lines tested negative for mycoplasma contamination. To generate BEZ235-resistant cell lines, parental cells were cultured with increasing concentrations of BEZ235 starting with a concentration of 0.1 nM. Fresh drug was added every 72 hours. Resistant cells were maintained as polyclonal populations under constant 50 nM BEZ235 selection. aCGH analysis of both the parental and resistant cells confirmed that the cells were derived from the same origin.

### Reagents

BEZ235 (dual PI3K/mTOR inhibitor) was purchased from Selleck Chemicals (Houston, TX, USA) and was prepared as a 2.1 mmol/L stock solution in DMSO and stored at -80°C. EPZ011989, a selective EZH2 inhibitor, was synthesized and provided by Epizyme Inc. (Cambridge, MA, USA). The chemotherapy drugs doxorubicin and gemcitabine were purchased from Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Cultured cells were treated with medium changes and fresh drug additions as indicated in the figure legends.

### Cell viability assay

Cells were seeded in triplicate at 5000 cells/well into 96-well plates, cultured with fresh growth medium for at least 24 hours and treated with a range of increasing concentrations of BEZ235 for 72 hours. For BEZ235 and EPZ011989 combination studies, cells were pretreated for one week with a single dose of EZH2 inhibitor before seeding. Cell viability was assessed by MTT (2-deoxyglucose (2-DG) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). The absorbance at 570 nm was monitored



using a Flexstation 3 Plate reader (Sunnyvale, CA, USA), using 630 nm as a reference. The half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was calculated with GraphPad Prism software version 5.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Each experiment was repeated at least 3 times.

### **Determination of apoptosis**

LMS cells were seeded in 6-well plates and treated for 72 hours with several drug concentrations. After treatment, cells were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) and labeled with annexin-V-FITC and propidium iodide (PI) according to the manufacturer's protocol (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Then, apoptosis was determined by fluorescence-activated cell-sorting (FACS Calibur flow cytometer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) analysis of annexin-V-FITC and PI labelling. The percentage of cells in early apoptosis (annexin-V-positive, PI-negative) and in late apoptosis or necrosis (annexin-V- and PI-positive) was calculated using FlowJo version 7.6.3 for Windows (Tree Star Inc, Ashland, OR, USA). The percentages of overall death (sum of early and late apoptosis) are represented as the mean  $\pm$  SEM values based on 3 independent experiments.

### **Clinical samples**

An ongoing trial is investigating the combination of imatinib plus a PI3K $\alpha$  inhibitor (BYL719) as third line treatment (NCT01735968). Some patients with PI3K $\alpha$ -resistant GIST were enrolled, and three pairs of primary and PI3K $\alpha$  inhibitor-resistant tumors from the same patients were selected.

### **Sequencing**

RNAseq was performed by GATC Biotech (Konstanz, Germany) using standard Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) protocols using the HiSeq2500 sequencing engine. Quantity and purity of double-stranded cDNA were verified by GATC Biotech using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany). Sequencing libraries were constructed from double-stranded cDNA samples according to the Illumina Genome Analyzer II protocol (44), followed by direct cDNA sequencing in paired end mode with a read length 2 x 125 bp. Then, 30 million read pairs were generated for each sample and FASTQ sequence files were generated by CASAVA.

### **NGS RNAseq sequence alignment and quality control pipeline**

Raw RNAseq sequences were controlled for quality using a set of published tools to produce curated reads. Firstly, reads with low quality bases at 5' and 3' were trimmed using the Sickle package (Phred cut off 20, max trim size 30 nc) (45). The SeqPrep package was used to remove sequencing adaptors from raw reads (46). This package also detected an important proportion of RNA fragments whose R1 and R2 paired-end reads were overlapping and merged them into single-end reads. To keep exploiting those fragment, a home-made python script was developed that split those merged reads into new non-overlapping R1 and R2 paired-end reads. Curated reads were aligned using TOPHAT2 (aka BOWTIE2) on both the UCSC hg19 reference genome and transcriptome (47). Finally, we applied a post-alignment quality control of aligned reads by removing reads with mapping scores lower than 20 using Samtools (48). PCR duplicate reads were identified and removed using Picard MarkDuplicates (<https://broadinstitute.github.io>). Read counts were performed using the Python module HTSeq (49).

For clinical samples, only one sample per condition was sequenced which was not statistically congruent with differential expression analysis. We avoided this problem by splitting FASTQ files into three equivalent parts to obtain three subsamples per condition.

### **Differential analysis**

Transcript count data were normalized according the VOOM method, which transforms raw count values to log<sub>2</sub>-counts per million (logCPM), estimates the mean-variance relationship and uses this relationship to compute appropriate observational-level weights (50). The RNAseq differential gene expression between groups of samples was performed using the statistical t-test from the R package LIMMA, which calculates fold changes and nominal p-values related to each gene starting from raw expression values and the normalization weights produced by VOOM (51). The set of nominal p-values from each test were adjusted according to the Benjamini-Hochberg adjustment (52). We defined the significantly up- or down-regulated transcripts using an FDR threshold of 0.05. The fold-change used to further filter the differential gene expression was set to a minimum value of 2. The differential expression status of all genes presenting significant variations is summarized in Tables S1, S2, S3 and S4.

### **Gene Set-Enrichment Analysis**

MSigDB (53) and Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, QIAGEN Redwood City) were used to identify pathways or gene ontologies in which the genes of an identified group were enriched.

With MSigDB, we used the C2 (canonical pathways) and C5 (biological processes) databases. Oncogene and Tumor Suppressor Gene status (approximately 800 known genes) was assigned according to the annotation in Cancer Gene Panel (54, 55). The functional annotation database DAVID was used to annotate gene lists of interest (56).

### **Aldefluor assay**

The Aldefluor Kit (Stem Cell Technologies, Durham, NC, USA) was used to detect stem cells with high ALDH enzyme activity according to the manufacturer's instructions. Briefly, 5 x 10<sup>5</sup> cells were resuspended in the Aldefluor assay buffer containing the ALDH substrate. As a negative control, an aliquot of Aldefluor-exposed cells was immediately quenched with diethylaminobenzaldehyde (DEAB) which is a specific ALDH inhibitor. Following an incubation of 30 min at 37°C, the cells were washed and sorted as ALDH<sup>+</sup> or ALDH<sup>-</sup> cells using a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences). The SKBR3 cell line was used as positive control.

### **Sphere-forming assay**

For the sphere formation assay, a total of 1 000 FACS-sorted cells were suspended in a stem-cell-permissive medium containing Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-F12) with N2 supplement (Invitrogen), 20 ng/mL EGF and 20 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF), plated in nonadherent 24-well plates and incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator. After 15 days, spheres were counted and photographed under a light microscope using a x20 objective. The self-renewal ability of cells dissociated from tumorspheres by trypsin/EDTA and seeded in new nonadherent 24-well plates was evaluated after 15 days.

### **Animal studies**

LMS cells (5 x 10<sup>6</sup> cells/100 µL) were injected subcutaneously into the right flank of Rag2C<sup>-/-</sup> mice (n = 8). Only the IB136 cell line was able to grow in mice. Once palpable, tumor volumes were calculated using the following formula: length x width<sup>2</sup> / 2. After tumors reached approximately 100 mm<sup>3</sup> in average size, animals were treated by oral gavage (100 µL). BEZ235 and EPZ011989 were prepared by dissolving them in 1 volume of NMP (1-methyl-2-pyrrolidone) and 9 volumes of PEG300 (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). To study the effect of PI3K/mTOR pathway inhibition on LMS tumor growth, mice were randomly assigned to receive 40 mg/kg of BEZ235 or vehicle (NMP/PEG300). To study the anti-tumor effect of BEZ235 and EPZ011989 alone or in combination, mice were randomly pretreated with

vehicle or 125 mg/kg of EPZ011989 BID for 2 weeks. Then, in the EPZ011989-pretreated group, mice were randomly treated for 3 weeks with 40 mg/kg of BEZ235 or 125 mg/kg of EPZ011989 BID. At the end of the experiments, mice were euthanized, and tumors were excised. Tumor progression was analyzed with GraphPad Prism software, and Kaplan-Meier curve analysis was used to compare individual tumor doubling rates. Log-rank (Mantel-Cox) tests were used to compare Kaplan-Meier curves using GraphPad Prism; p-values of 0.05 and below were considered significant.

### **Immunohistochemistry**

Immunohistochemical methods were described previously (22). Sections of tumor samples and LMS cell line pellets were incubated with either anti-Ki-67 (Ventana 790-4286; 1:100), anti-p-S6RPser240/244 (CST 5364; 1:100), anti-H3K27Me3 (CST 9733S; 1:100) or anti-SOX2 (Ventana 760-4621; 1:100). To confirm a negative labeling in tissues, we used endothelial cells as a positive control. Tissue imaging was conducted with an Olympus CKX41 (x100) using image capture cellSens Entry software version 1.14 for Windows (Olympus, Rungis, France). A pathologist estimated the immunoreactivity signal corresponding to the target expression level based on the percentage of positively stained cells.

### **Statistics**

The data were presented as the mean  $\pm$  SEM. Differences in mean values between two groups were analyzed by two-tailed Student's t-tests. Differences in three or more than three groups were analyzed by one-way or two-way ANOVA, followed by the post hoc Tukey's honest significant difference test. A  $p < 0.05$  was required for results to be considered statistically significant.

### **Study approval**

The study protocols were approved by the Direction for Clinical Research of the Bergonié Institute of Bordeaux and the methods were carried out in accordance with the approved guidelines and with written informed consent from all patients. All animal experiments under project license APAFIS 8414 were performed with the approval of the institutional animal use and care committee.

## References

1. C. Fletcher, J. Bridge, P. Hogendoorn, F. eds Mertens, World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of soft Tissue and bone. (Lyon: IARC Press, 4th edn., 2013).
2. M. A. Clark, C. Fisher, I. Judson, J. M. Thomas, Soft-tissue sarcomas in adults, *N. Engl. J. Med.* 353, 701–711 (2005).
3. P. J. Woll, P. Reichardt, A. Le Cesne, S. Bonvalot, A. Azzarelli, H. J. Hoekstra, M. Leahy, F. Van Coevorden, J. Verweij, P. C. W. Hogendoorn, M. Ouali, S. Marreaud, V. H. C. Bramwell, P. Hohenberger, EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group and the NCIC Clinical Trials Group Sarcoma Disease Site Committee, Adjuvant chemotherapy with doxorubicin, ifosfamide, and lenograstim for resected soft-tissue sarcoma (EORTC 62931): a multicentre randomised controlled trial, *Lancet Oncol.* 13, 1045–1054 (2012).
4. R. A. Gladdy, L.-X. Qin, N. Moraco, N. P. Agaram, M. F. Brennan, S. Singer, Predictors of Survival and Recurrence in Primary Leiomyosarcoma, *Ann. Surg. Oncol.* 20, 1851–1857 (2013).
5. N. P. Agaram, L. Zhang, F. LeLoarer, T. Silk, Y.-S. Sung, S. N. Scott, D. Kuk, L.-X. Qin, M. F. Berger, C. R. Antonescu, S. Singer, Targeted exome sequencing profiles genetic alterations in leiomyosarcoma, *Genes. Chromosomes Cancer* 55, 124–130 (2016).
6. L. Guillou, A. Aurias, Soft tissue sarcomas with complex genomic profiles, *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 456, 201–217 (2010).
7. A. Italiano, P. Lagarde, C. Brulard, P. Terrier, M. Laë, B. Marques, D. Ranchere-Vince, J.-J. Michels, M. Trassard, A. Cioffi, S. Piperno-Neumann, C. Chevreau, J.-Y. Blay, C. Delcambre, N. Isambert, N. Penel, J.-O. Bay, S. Bonvalot, A. Le Cesne, J.-M. Coindre, F. Chibon, Genetic profiling identifies two classes of soft-tissue leiomyosarcomas with distinct clinical characteristics, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 1190–1196 (2013).
8. J. Hu, U. N. M. Rao, S. Jasani, V. Khanna, K. Yaw, U. Surti, Loss of DNA copy number of 10q is associated with aggressive behavior of leiomyosarcomas: a comparative genomic hybridization study, *Cancer Genet. Cytogenet.* 161, 20–27 (2005).
9. L. Gibault, C. Ferreira, G. Pérot, A. Audebourg, F. Chibon, S. Bonnin, P. Lagarde, M.-C. Vacher-Lavenu, P. Terrier, J.-M. Coindre, A. Aurias, From PTEN loss of expression to RICTOR role in smooth muscle differentiation: complex involvement of the mTOR pathway

in leiomyosarcomas and pleomorphic sarcomas, *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 25, 197–211 (2012).

10. E. Hernando, E. Charytonowicz, M. E. Dudas, S. Menendez, I. Matushansky, J. Mills, N. D. Succi, N. Behrendt, L. Ma, R. G. Maki, P. P. Pandolfi, C. Cordon-Cardo, The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas, *Nat. Med.* 13, 748–753 (2007).

11. C. Forscher, M. Mita, R. Figlin, Targeted therapy for sarcomas, *Biol. Targets Ther.* 8, 91–105 (2014).

12. A. Italiano, M. Kind, E. Stoeckle, N. Jones, J.-M. Coindre, B. Bui, Temsirolimus in advanced leiomyosarcomas: patterns of response and correlation with the activation of the mammalian target of rapamycin pathway, *Anticancer. Drugs* 22, 463–467 (2011).

13. A. Carracedo, L. Ma, J. Teruya-Feldstein, F. Rojo, L. Salmena, A. Alimonti, A. Egia, A. T. Sasaki, G. Thomas, S. C. Kozma, A. Papa, C. Nardella, L. C. Cantley, J. Baselga, P. P. Pandolfi, Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer, *J. Clin. Invest.* 118, 3065–3074 (2008).

14. K. E. O'Reilly, F. Rojo, Q.-B. She, D. Solit, G. B. Mills, D. Smith, H. Lane, F. Hofmann, D. J. Hicklin, D. L. Ludwig, J. Baselga, N. Rosen, mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt, *Cancer Res.* 66, 1500–1508 (2006).

15. A. Carracedo, P. P. Pandolfi, The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks, *Oncogene* 27, 5527–5541 (2008).

16. G. D. Demetri, S. P. Chawla, I. Ray-Coquard, A. Le Cesne, A. P. Staddon, M. M. Milhem, N. Penel, R. F. Riedel, B. Bui-Nguyen, L. D. Cranmer, P. Reichardt, E. Bompas, T. Alcindor, D. Rushing, Y. Song, R.-M. Lee, S. Ebbinghaus, J. E. Eid, J. W. Loewy, F. G. Haluska, P. F. Dodiya, J.-Y. Blay, Results of an international randomized phase III trial of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus versus placebo to control metastatic sarcomas in patients after benefit from prior chemotherapy, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 2485–2492 (2013).

17. J. A. Engelman, J. Luo, L. C. Cantley, The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism, *Nat. Rev. Genet.* 7, 606–619 (2006).

18. L.-A. Julien, A. Carriere, J. Moreau, P. P. Roux, mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling, *Mol. Cell. Biol.* 30, 908–921 (2010).

19. Y.-R. Zhu, H. Min, J.-F. Fang, F. Zhou, X.-W. Deng, Y.-Q. Zhang, Activity of the novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 against osteosarcoma, *Cancer Biol. Ther.* 16, 602–609 (2015).
20. M. Hugle, S. Fulda, Dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 synergizes with chloroquine to induce apoptosis in embryonal rhabdomyosarcoma, *Cancer Lett.* 360, 1–9 (2015).
21. R. Chaisuparat, J. Hu, B. C. Jham, Z. A. Knight, K. M. Shokat, S. Montaner, Dual inhibition of PI3K $\alpha$  and mTOR as an alternative treatment for Kaposi's sarcoma, *Cancer Res.* 68, 8361–8368 (2008).
22. B. Fourneaux, V. Chaire, C. Lucchesi, M. Karanian, R. Pineau, A. Laroche-Clary, A. Italiano, Dual inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway suppresses the growth of leiomyosarcomas but leads to ERK activation through mTORC2: biological and clinical implications, *Oncotarget* 8, 7878–7890 (2017).
23. H.-J. Bühring, S. Treml, F. Cerabona, P. de Zwart, L. Kanz, M. Sobiesiak, Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1176, 124–134 (2009).
24. J. S. Moreb, D. Ucar, S. Han, J. K. Amory, A. S. Goldstein, B. Ostmark, L.-J. Chang, The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance, *Chem. Biol. Interact.* 195, 52–60 (2012).
25. U. Basu-Roy, N. S. Bayin, K. Rattanakorn, E. Han, D. G. Placantonakis, A. Mansukhani, C. Basilico, Sox2 antagonizes the Hippo pathway to maintain stemness in cancer cells, *Nat. Commun.* 6, 6411 (2015).
26. M. Morikawa, D. Koinuma, A. Mizutani, N. Kawasaki, K. Holmborn, A. Sundqvist, S. Tsutsumi, T. Watabe, H. Aburatani, C.-H. Heldin, K. Miyazono, BMP Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal through Distinct Functions of Different Krüppel-like Factors, *Stem Cell Rep.* 6, 64–73 (2016).
27. C. Ginestier, M. H. Hur, E. Charafe-Jauffret, F. Monville, J. Dutcher, M. Brown, J. Jacquemier, P. Viens, C. G. Kleer, S. Liu, A. Schott, D. Hayes, D. Birnbaum, M. S. Wicha, G. Dontu, ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome, *Cell Stem Cell* 1, 555–567 (2007).
28. R. W. Storms, A. P. Trujillo, J. B. Springer, L. Shah, O. M. Colvin, S. M. Ludeman, C. Smith, Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9118–9123 (1999).

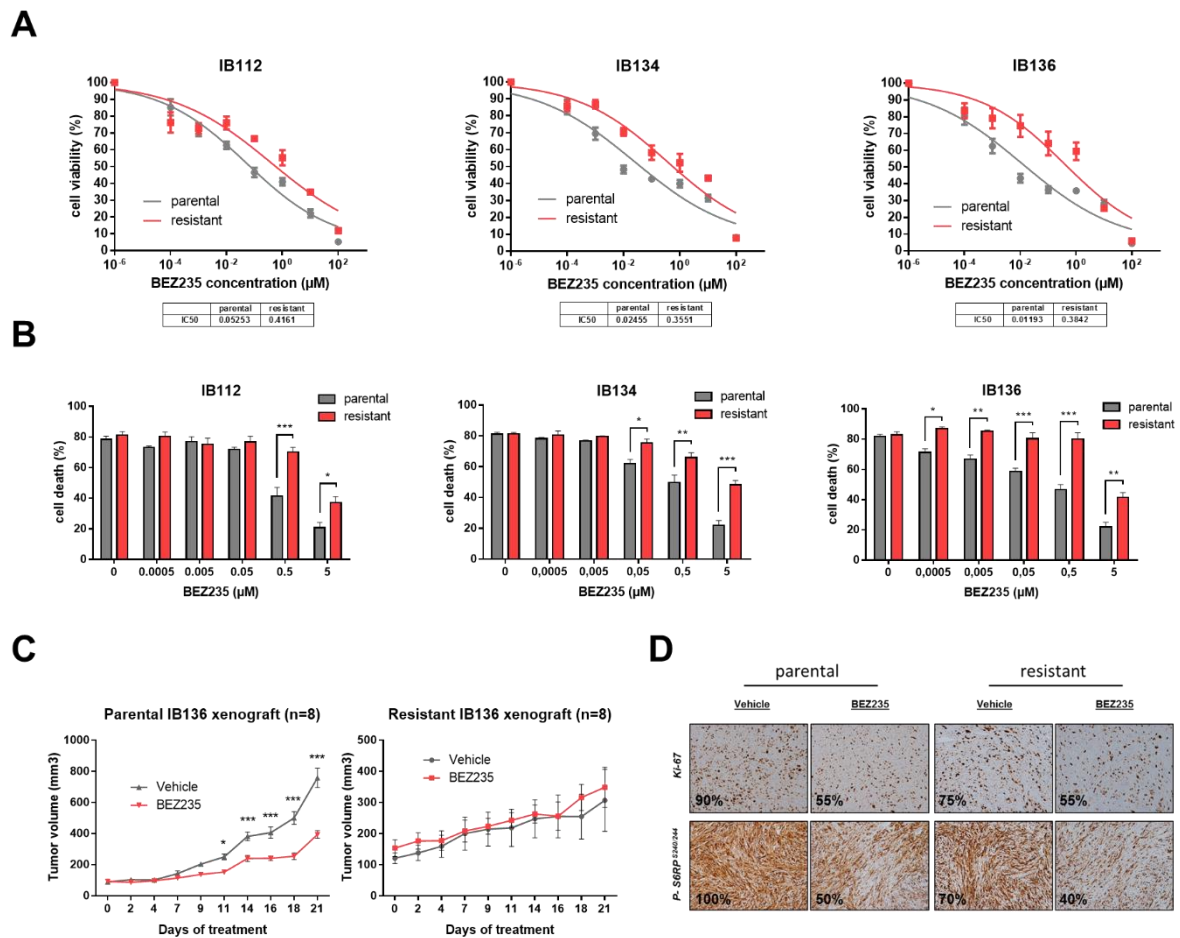
29. M. Nishimoto, S. Miyagi, T. Yamagishi, T. Sakaguchi, H. Niwa, M. Muramatsu, A. Okuda, Oct-3/4 Maintains the Proliferative Embryonic Stem Cell State via Specific Binding to a Variant Octamer Sequence in the Regulatory Region of the UTF1 Locus, *Mol. Cell. Biol.* 25, 5084–5094 (2005).
30. J. Nichols, B. Zevnik, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Schöler, A. Smith, Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4, *Cell* 95, 379–391 (1998).
31. D. O’Carroll, S. Erhardt, M. Pagani, S. C. Barton, M. A. Surani, T. Jenuwein, The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development, *Mol. Cell. Biol.* 21, 4330–4336 (2001).
32. H. A. Burris, Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 71, 829–842 (2013).
33. Y.-M. Ma, S. Zhao, Prognostic values of aldehyde dehydrogenase 1 isoenzymes in ovarian cancer, *OncoTargets Ther.* 9, 1981–1988 (2016).
34. K. Li, X. Guo, Z. Wang, X. Li, Y. Bu, X. Bai, L. Zheng, Y. Huang, The prognostic roles of ALDH1 isoenzymes in gastric cancer, *OncoTargets Ther.* 9, 3405–3414 (2016).
35. M. Flahaut, N. Jauquier, N. Chevalier, K. Nardou, K. Balmas Bourlourd, J.-M. Joseph, D. Barras, C. Widmann, N. Gross, R. Renella, A. Mühlethaler-Mottet, Aldehyde dehydrogenase activity plays a Key role in the aggressive phenotype of neuroblastoma, *BMC Cancer* 16, 781 (2016).
36. S. Wu, W. Xue, X. Huang, X. Yu, M. Luo, Y. Huang, Y. Liu, Z. Bi, X. Qiu, S. Bai, Distinct prognostic values of ALDH1 isoenzymes in breast cancer, *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 36, 2421–2426 (2015).
37. N. M. Jones, M. R. Rowe, P. R. Shepherd, M. J. McConnell, Targeted inhibition of dominant PI3-kinase catalytic isoforms increase expression of stem cell genes in glioblastoma cancer stem cell models, *Int. J. Oncol.* 49, 207–216 (2016).
38. N. E. Bhola, V. M. Jansen, J. P. Koch, H. Li, L. Formisano, J. A. Williams, J. R. Grandis, C. L. Arteaga, Treatment of Triple-Negative Breast Cancer with TORC1/2 Inhibitors Sustains a Drug-Resistant and Notch-Dependent Cancer Stem Cell Population, *Cancer Res.* 76, 440–452 (2016).
39. L. A. Boyer, K. Plath, J. Zeitlinger, T. Brambrink, L. A. Medeiros, T. I. Lee, S. S. Levine, M. Wernig, A. Tajonar, M. K. Ray, G. W. Bell, A. P. Otte, M. Vidal, D. K. Gifford, R. A. Young, R. Jaenisch, Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells, *Nature* 441, 349–353 (2006).



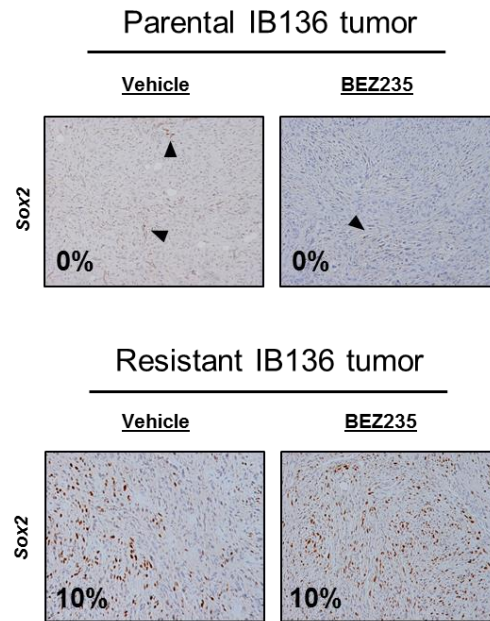
40. X. Shen, Y. Liu, Y.-J. Hsu, Y. Fujiwara, J. Kim, X. Mao, G.-C. Yuan, S. H. Orkin, EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency, *Mol. Cell* 32, 491–502 (2008).
41. H. Richly, L. Aloia, L. Di Croce, Roles of the Polycomb group proteins in stem cells and cancer, *Cell Death Dis.* 2, e204 (2011).
42. L. E. Moritz, R. C. Trievel, Structure, mechanism, and regulation of polycomb repressive complex 2, *J. Biol. Chem.* (2017), doi:10.1074/jbc.R117.800367.
43. C. Kadoch, G. R. Crabtree, Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer: Mechanistic insights gained from human genomics, *Sci. Adv.* 1, e1500447 (2015).
44. B. T. Wilhelm, J.-R. Landry, RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing, *Methods San Diego Calif* 48, 249–257 (2009).
45. najoshi, sickle: Windowed Adaptive Trimming for fastq files using quality (2017; <https://github.com/najoshi/sickle>).
46. J. S. John, SeqPrep: Tool for stripping adaptors and/or merging paired reads with overlap into single reads (2017; <https://github.com/jstjohn/SeqPrep>).
47. B. Langmead, S. L. Salzberg, Fast gapped-read alignment with Bowtie 2, *Nat. Methods* 9, 357–359 (2012).
48. H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup, The Sequence Alignment/Map format and SAMtools, *Bioinforma. Oxf. Engl.* 25, 2078–2079 (2009).
49. S. Anders, P. T. Pyl, W. Huber, HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data, *Bioinforma. Oxf. Engl.* 31, 166–169 (2015).
50. C. W. Law, Y. Chen, W. Shi, G. K. Smyth, voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts, *Genome Biol.* 15, R29 (2014).
51. M. E. Ritchie, B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C. W. Law, W. Shi, G. K. Smyth, limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies, *Nucleic Acids Res.* 43, e47 (2015).
52. Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing, *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 57, 289–300 (1995).
53. A. Subramanian, P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander, J. P. Mesirov, Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15545–15550 (2005).

54. B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz, K. W. Kinzler, Cancer genome landscapes, *Science* 339, 1546–1558 (2013).
55. R. R. Singh, K. P. Patel, M. J. Routbort, K. Aldape, X. Lu, J. Manekia, R. Abraham, N. G. Reddy, B. A. Barkoh, J. Veliyathu, L. J. Medeiros, R. Luthra, Clinical massively parallel next-generation sequencing analysis of 409 cancer-related genes for mutations and copy number variations in solid tumours, *Br. J. Cancer* 111, 2014–2023 (2014).
56. D. W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists, *Nucleic Acids Res.* 37, 1–13 (2009).

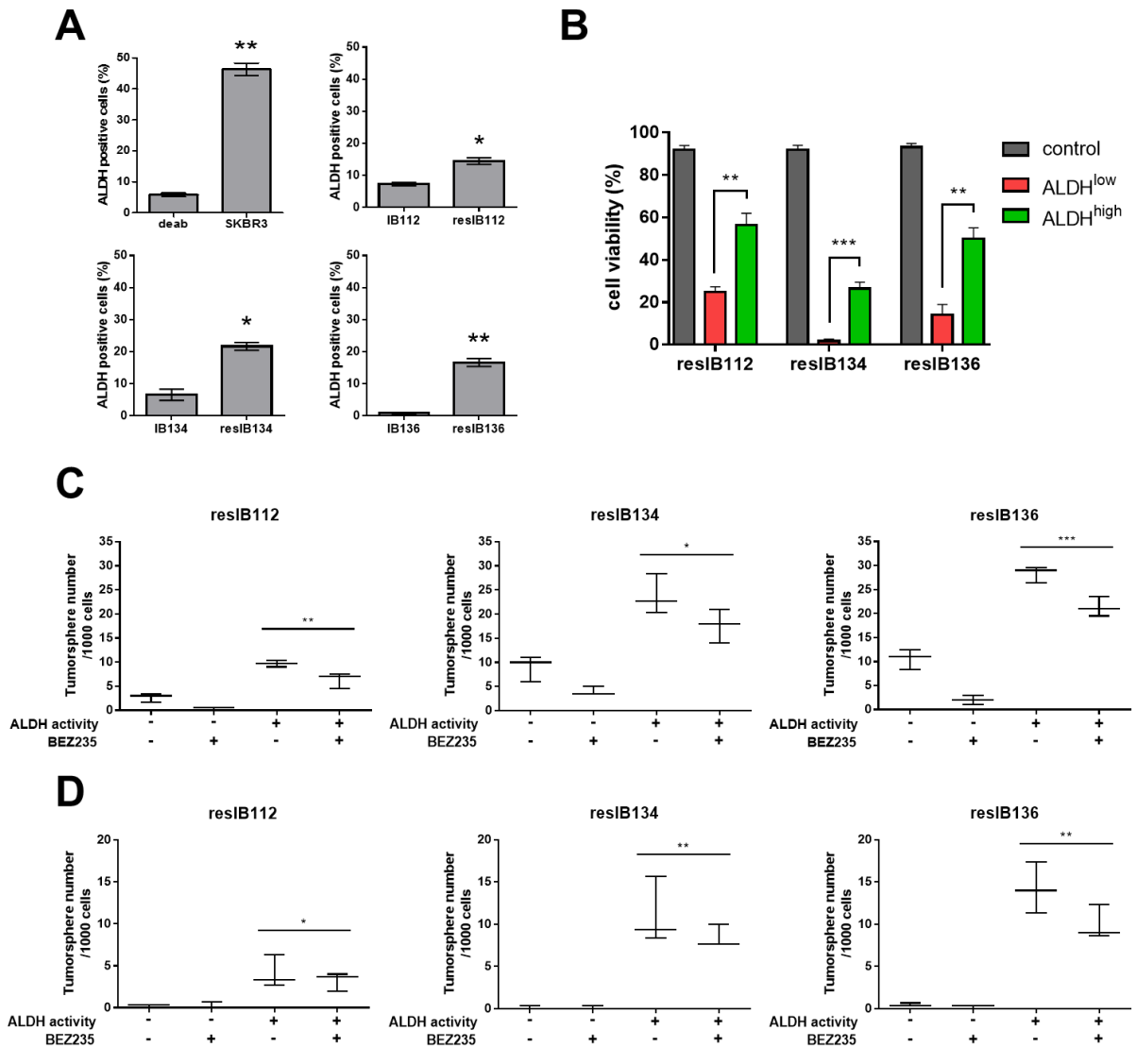
## Figures and Tables



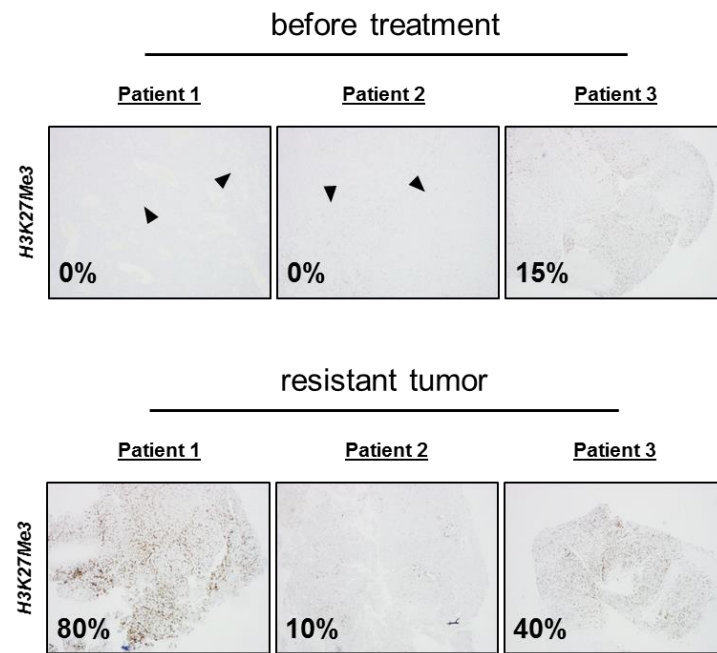
**Fig. 1. Antitumor effect of BEZ235 in parental and resistant leiomyosarcoma (LMS) cell lines and in IB136 and resIB136-derived xenografts in Ragy2C<sup>-/-</sup> mice. (A)** Growth curves indicating growth inhibition of the three parental (IB112, IB134 and IB136) and resistant (resIB112, resIB134 and resIB136) LMS cell lines after BEZ235 treatment for 72 hours. IC<sub>50</sub> is indicated in µM. **(B)** Percentage of apoptotic cells after BEZ235 treatment for 72 hours. Data are presented as the mean ± SEM of three independent experiments. \*, resistant  $p < 0.05$  vs. parental; \*\*, resistant  $p < 0.01$  vs. parental; \*\*\*, resistant  $p < 0.001$  vs. parental (two-way ANOVA). **(C)** Tumor volume progression curves over 3 weeks of BEZ235 treatment. Mice were randomly assigned to receive 40 mg/kg of BEZ235 or vehicle. The data points represent an average from 8 mice (bars, SEM). \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , two-way ANOVA. **(D)** Immunohistochemical staining images of tumor samples treated with anti-pS6RP<sup>Ser240/244</sup> and anti-Ki-67 antibodies (objective magnification, x10). Percentages correspond to positively stained cells estimated by a pathologist.



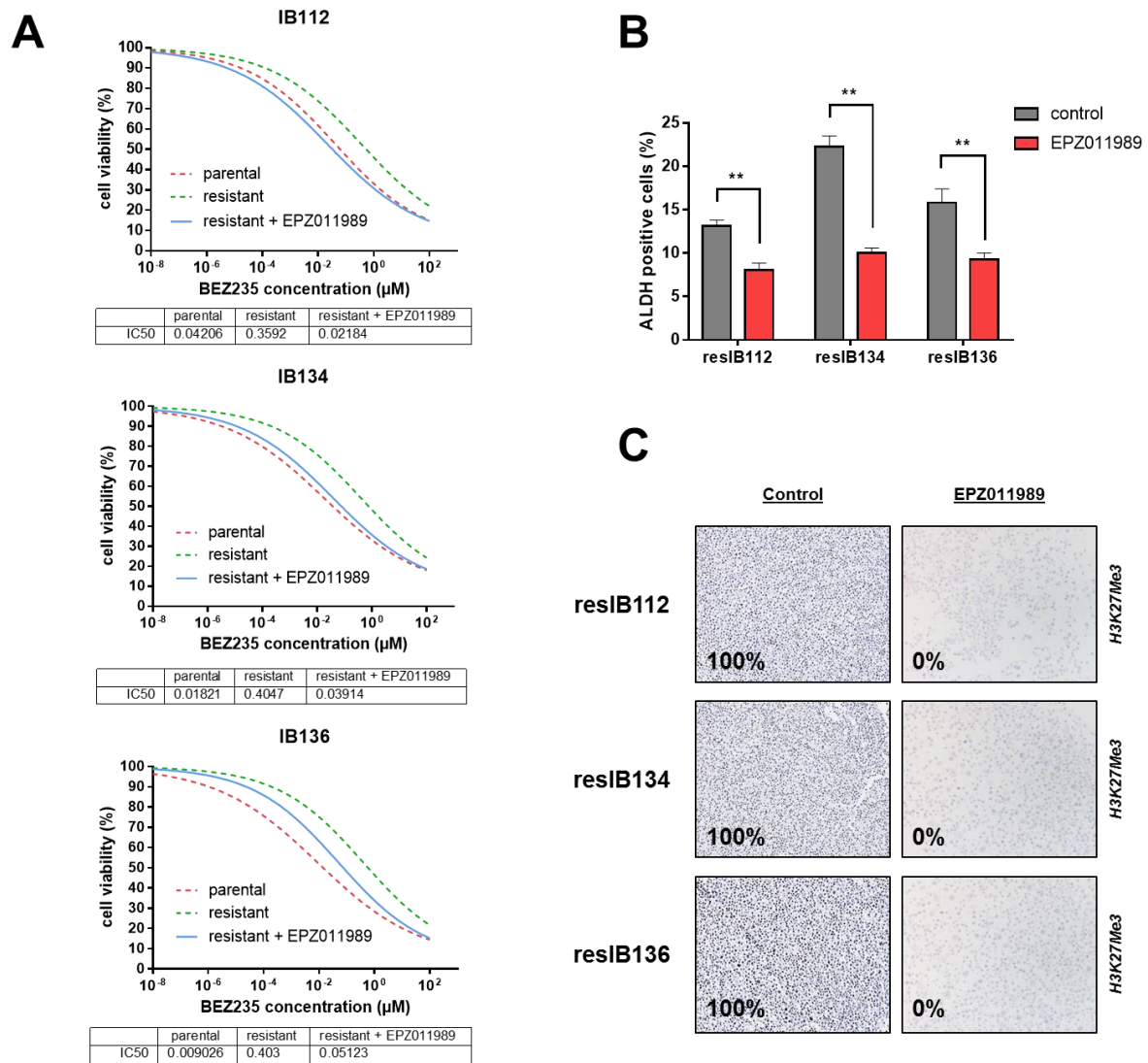
**Fig. 2. Immunohistochemical staining for SOX2.** Immunohistochemical staining images of parental and resistant IB136 tumor samples treated with anti-Sox2 antibody (objective magnification, x10). Percentages correspond to positively stained cells estimated by a pathologist. Endothelial cells (positive control) are indicated by black arrows.



**Fig. 3 Measurement of ALDH activity and its role in tumorigenicity and chemoresistance. (A)** Percentage of parental and resistant cells with ALDH activity as determined by flow cytometry. The SKBR3 cell line represents a positive control in the Aldefluor assay. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*, resistant  $p < 0.05$  vs. parental; \*\*, resistant  $p < 0.01$  vs. parental (two-tailed Student's t-tests). **(B)** Percentage of viable ALDH<sup>high</sup> and ALDH<sup>low</sup> FACS-sorted BEZ235-resistant cells after 72 hours of 0.3  $\mu$ M of BEZ235 treatment. The results represent the mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , one-way ANOVA. **(C)** Plots (min and max) represent the number of tumorspheres formed after 15 days without or with 0.3  $\mu$ M of BEZ235 in ALDH<sup>high</sup> and ALDH<sup>low</sup> subpopulation. The results represent the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , one-way ANOVA. **(D)** Plots (min and max) represent the number of tumorspheres formed after 15 days by cells dissociated from tumorspheres. The results represent the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , one-way ANOVA.

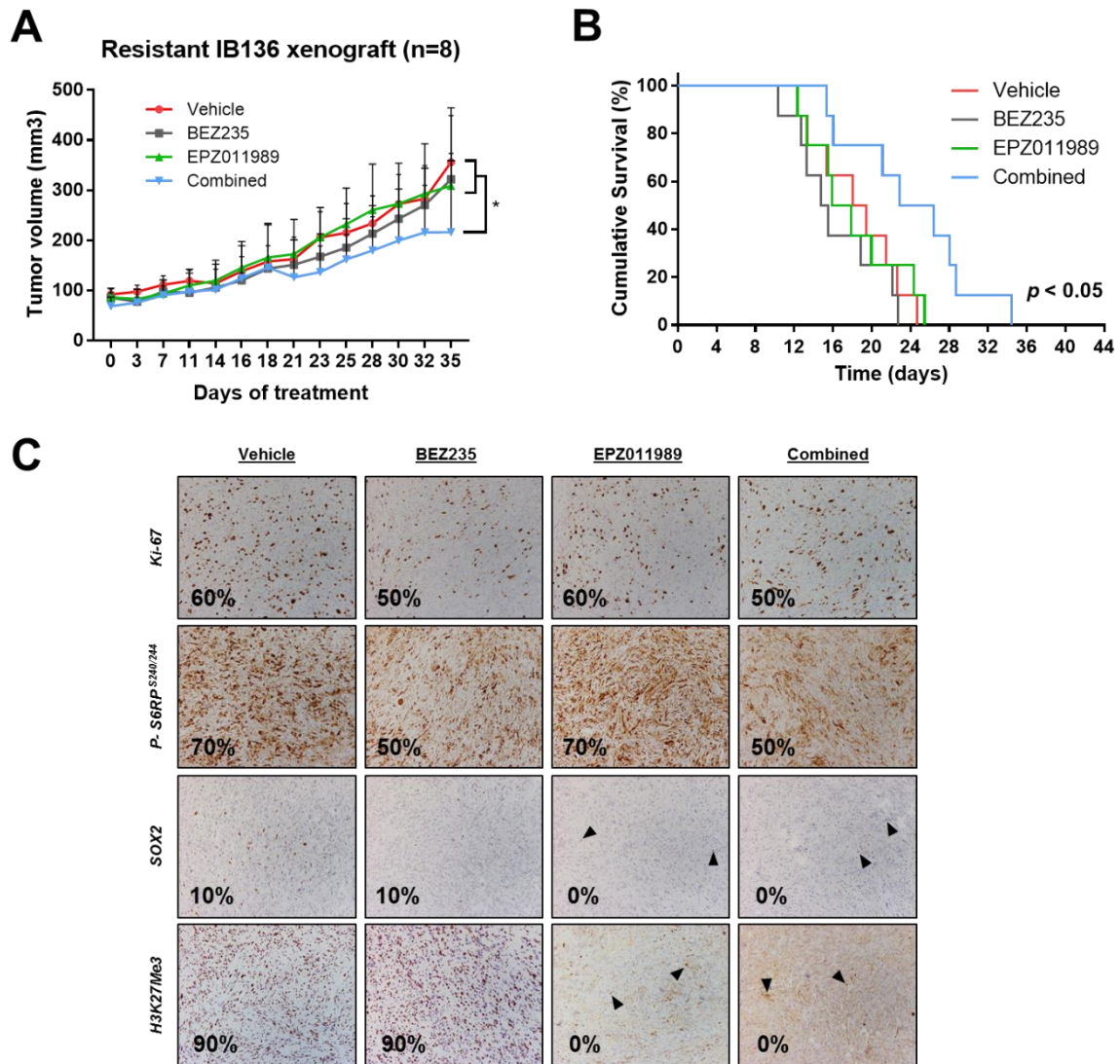


**Fig. 4. Immunohistochemical staining for H3K27Me3.** Immunohistochemical staining images of three pairs of primary and PI3K $\alpha$  inhibitor-resistant sarcoma tumor samples treated with anti-H3K27Me3 antibody (objective magnification, x10). Percentages correspond to positively stained cells estimated by a pathologist. Endothelial cells (positive control) are indicated by black arrows.



**Fig. 5. Effect of EPZ011989 pretreatment on BEZ235 sensitivity and on the CSC-like subpopulation in resistant leiomyosarcoma cell lines.** (A) Growth curves indicating growth inhibition of the three resistant (resIB112, resIB134 and resIB136) LMS cell lines after BEZ235 treatment for 72 hours. Resistant + EPZ011989 correspond to cells which were pretreated for one week with 10 µM of EPZ011989. IC<sub>50</sub> is indicated in µM. (B) Percentage of cells with ALDH activity, as determined by flow cytometry on resistant cell lines exposed to 10 µM of EPZ011989 for one week. Data are presented as the mean ± SEM of three independent experiments. \*\**p* < 0.01, two-tailed Student's *t*-tests. (C) Immunohistochemical staining images of BEZ235-resistant LMS cell line pellets treated with anti-H3K27Me3 antibody (objective magnification, 10x). Percentage corresponds to positively stained cells estimated by a pathologist.





**Fig. 6. Effect of BEZ235 and EPZ011989 alone and in combination on resIB136-derived xenografts in Rgy2C<sup>-/-</sup> mice.** (A) Tumor volume progression curves during 5 weeks of treatment. Mice were randomly pretreated with vehicle or 125 mg/kg of EPZ011989 BID for 2 weeks. Then, in the EPZ011989-pretreated group, mice were randomly treated for 3 weeks with 40 mg/kg of BEZ235 or 125 mg/kg of EPZ011989 BID. The data points represent an average from 8 mice (bars, SEM). \* $p < 0.05$ , two-way ANOVA. (B) Kaplan-Meier curves for tumor doubling times. (C) Immunohistochemical staining images of tumor samples treated with anti-Ki-67, anti-pS6RP<sup>ser240/244</sup>, anti-SOX2 and anti-H3K27Me3 antibodies (objective magnification, x10). Percentage correspond to positively stained cells estimated by a pathologist. Endothelial cells (positive control) are indicated by black arrows.



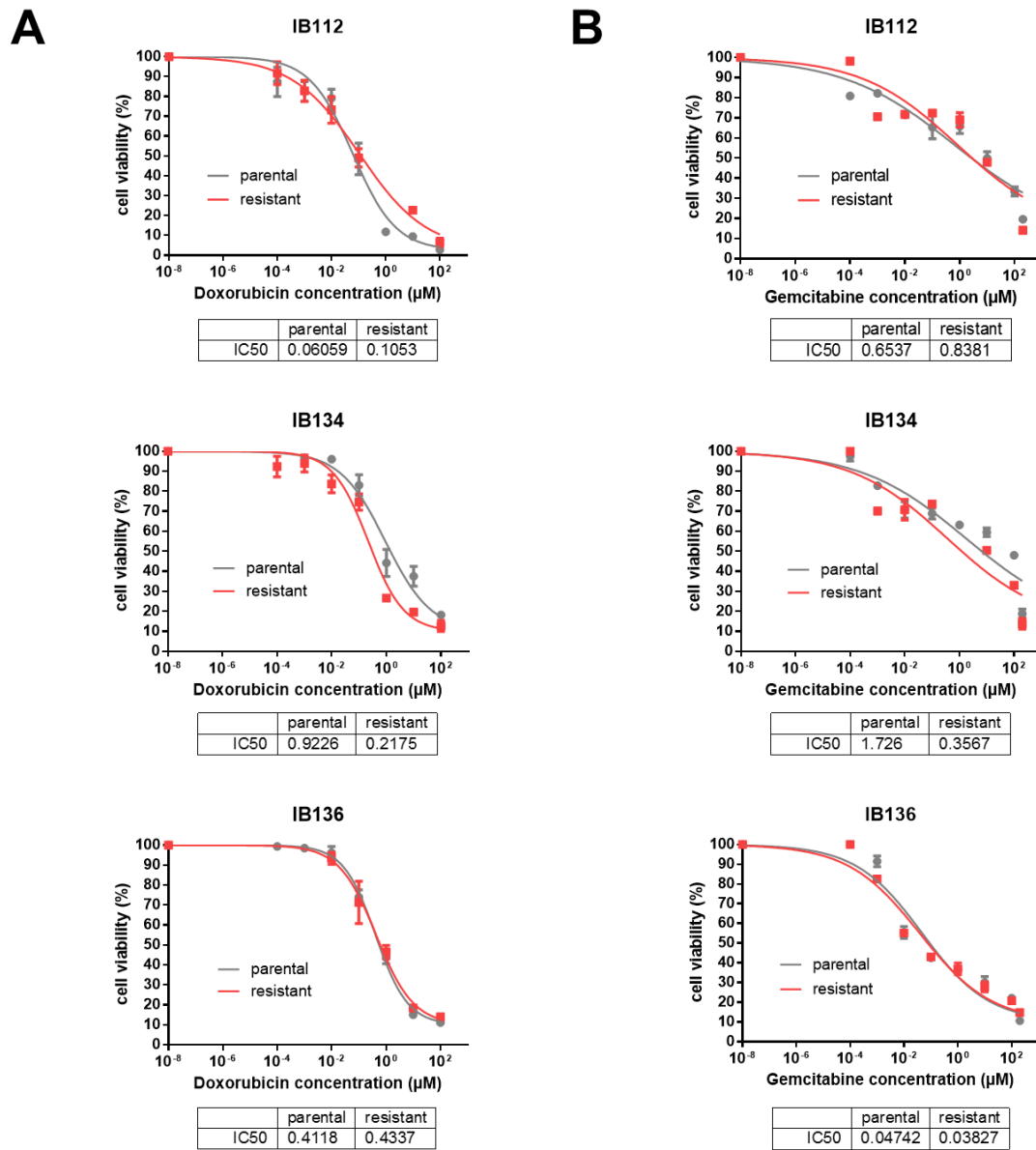
Symbol	Localization	Gene ID	p-value	Fold-change
NCAM1	chr11	neural cell adhesion molecule 1	1.1E-05	372.15
SFRP2	chr4	secreted frizzled-related protein 2	1.6E-03	36.63
BMP7	chr20	bone morphogenetic protein 7	4.9E-04	22.91
SPRY1	chr4	sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling	4.6E-03	16.04
BMPRI1B	chr4	bone morphogenetic protein receptor, type IB	3.5E-03	10.74
ALDH1A2	chr15	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2	1.9E-03	10.40
KLF5	chr13	KrDOWNpel-like factor 5 (intestinal)	1.1E-03	6.73
CXCR4	chr20	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	4.9E-03	6.43
DHRS3	chr1	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	4.9E-03	5.65
AXIN2	chr17	axin 2	4.2E-03	2.70
SOX2	chr3	SRY (sex determining region Y)-box 2	2.4E-03	2.50

**Table 1. Enrichment of cancer stem cell-like genes in resIB136 xenografts (with fold-changes and *p-values*)**

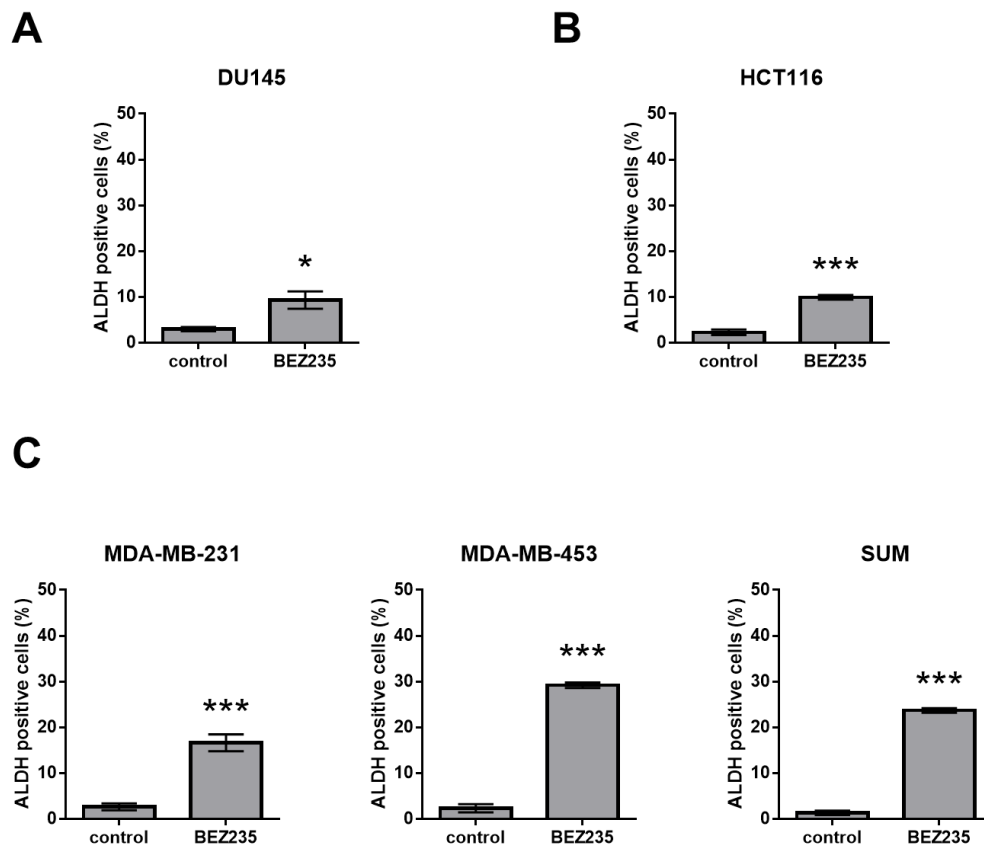
Symbol	Localization	Gene ID	p-value	Fold-change
POU5F1	chr6	POU class 5 homeobox 1	6.3E-11	38.75
SOX9	chr17	SRY (sex determining region Y)-box 9	1.6E-06	15.10
CRISPLD1	chr8	cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 1	7.3E-07	13.52
CD200	chr3	CD200 molecule	3.4E-06	8.07
ANGPT1	chr8	angiopoietin 1	8.7E-06	5.37
BDNF	chr11	brain-derived neurotrophic factor	1.3E-05	4.85
ARX	chrX	aristaless related homeobox	5.1E-03	4.35
SPP1	chr4	secreted phosphoprotein 1	3.9E-08	4.24

**Table 2. Enrichment of cancer stem cell-like genes in clinical sample (with fold-change and *p*-values)**

## Supplementary materials



**Fig. S1. Effect of doxorubicin and gemcitabine on cell growth in parental and resistant leiomyosarcoma (LMS) cell lines.** Growth curves indicating growth inhibition of the three parental (IB112, IB134 and IB136) and resistant (resIB112, resIB134 and resIB136) LMS cell lines after doxorubicin (A) or gemcitabine (B) treatment for 72 hours. IC<sub>50</sub> is indicated in µM. Data are presented as the mean ± SEM of three independent experiments.



**Fig. S2. Measurement of ALDH activity in cell lines derived from epithelial tumors.** Percentage of cells with ALDH activity as determined by flow cytometry after 1 $\mu$ M of BEZ235 treatment for 72 hours on prostate cancer DU145 cells (A), on HCT116 human colon cancer cells (B) and on MDA-MB-231, MDA-MB-453 and SUM breast cancer cell lines (C). Data are presented as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*, BEZ235  $p < 0.05$  vs. control; \*\*\*, BEZ235  $p < 0.001$  vs. control (two-tailed Student's t-tests).

Symbol	Localization	Gene ID	p-value	Fold-change
NCAM1	chr11	neural cell adhesion molecule 1	2,4E-07	372,15
TMEM98	chr17	transmembrane protein 98	8,8E-14	212,53
EPB41L3	chr18	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3	5,9E-04	176,59
MYO1D	chr17	myosin ID	2,9E-06	136,54
KCNS3	chr2	potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 3	1,1E-06	84,74
ADCY1	chr7	adenylate cyclase 1 (brain)	8,7E-06	78,46
RSPO3	chr6	R-spondin 3	3,9E-06	76,38
VAT1L	chr16	vesicle amine transport 1-like	8,8E-06	75,31
SAMD5	chr6	sterile alpha motif domain containing 5	6,6E-06	66,61
GUCY1B3	chr4	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	1,5E-07	59,77
GUCY1A3	chr4	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	9,6E-09	59,09
TMPPRSS15	chr21	transmembrane protease, serine 15	6,6E-06	53,95
RAMP3	chr7	receptor (G protein-coDOWNled) activity modifying protein 3	2,7E-13	45,39
NKD2	chr5	naked cuticle homolog 2 (Drosophila)	2,6E-03	39,45
LAMA2	chr6	laminin, alpha 2	1,7E-07	38,86
SFRP2	chr4	secreted frizzled-related protein 2	8,9E-05	36,63
PENK	chr8	proenkephalin	3,0E-05	31,61
ANK3	chr10	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	1,5E-07	29,47
FMOD	chr1	fibromodulin	3,5E-05	28,52
TDO2	chr4	tryptophan 2,3-dioxygenase	1,6E-04	27,08
LRRC38	chr1	leucine rich repeat containing 38	1,2E-13	26,18
SLC38A4	chr12	solute carrier family 38, member 4	2,5E-04	25,08
CXCL14	chr5	chemokine (C-X-C motif) ligand 14	7,7E-04	24,57
CXorf57	chrX	chromosome X open reading frame 57	6,8E-06	24,00
BMP7	chr20	bone morphogenetic protein 7	2,0E-05	22,91
KCNK1	chr1	potassium channel, subfamily K, member 1	3,4E-04	22,34
PTPN13	chr4	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 (APO-1/CD95 (Fas)-associated phosphatase)	2,3E-06	21,57
APCDD1	chr18	adenomatosis polyposis coli UP-regulated 1	1,2E-04	21,43
ACTG2	chr2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	5,5E-04	21,12
EGFL6	chrX	EGF-like-domain, multiple 6	1,9E-03	20,74
[ ... ]				
UNC5C	chr4	unc-5 homolog C (C. elegans)	1,4E-03	2,07
EYA2	chr20	eyes absent homolog 2 (Drosophila)	5,7E-12	2,07
KRT2	chr12	keratin 2	5,4E-12	2,07
OLFML2B	chr1	olfactomedin-like 2B	7,2E-03	2,07
DACT1	chr14	dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 1	1,0E-02	2,06
TLR8	chrX	toll-like receptor 8	8,5E-06	2,06
SEMA3E	chr7	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3E	1,0E-02	2,06
ZNF597	chr16	zinc finger protein 597	6,3E-03	2,06
CTSO	chr4	cathepsin O	6,4E-04	2,06
ADAMTS18	chr16	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 18	9,8E-04	2,06
GPR153	chr1	G protein-coDOWNled receptor 153	4,5E-04	2,06
MASP1	chr3	mannan-binding lectin serine peptidase 1 (C4/C2 activating component of Ra-reactive factor)	6,6E-03	2,05
PSTPIP2	chr18	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2	9,6E-05	2,05
C6	chr5	complement component 6	1,7E-10	2,05
VSTM2L	chr20	V-set and transmembrane domain containing 2 like	1,1E-02	2,04
PREX1	chr20	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 1	1,2E-03	2,04
ISLR2	chr15	immunoglobulin sDOWNerfamily containing leucine-rich repeat 2	8,0E-06	2,04
ARHGEF25	chr12	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 25	8,4E-09	2,04
MURC	chr9	muscle-related coiled-coil protein	6,4E-04	2,03
SORBS1	chr10	sorbin and SH3 domain containing 1	1,3E-03	2,03
MYLIP	chr6	myosin regulatory light chain interacting protein	1,7E-06	2,03
MMP7	chr11	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	2,5E-11	2,03
NLRP11	chr19	NLR family, pyrin domain containing 11	2,3E-04	2,02
STARD10	chr11	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 10	6,8E-03	2,02
MRC2	chr17	mannose receptor, C type 2	2,9E-03	2,01
SCNN1D	chr1	sodium channel, non-voltage-gated 1, delta subunit	3,2E-05	2,01
SLC15A2	chr3	solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 2	3,7E-03	2,01
DTNA	chr18	dystrobrevin, alpha	1,3E-06	2,01
MRAP2	chr6	melanocortin 2 receptor accessory protein 2	1,6E-03	2,01
MANBA	chr4	mannosidase, beta A, lysosomal	2,9E-04	2,00

**Table S1. List of up-regulated genes in resIB136 xenografts (with fold-change and p-values).**

Symbol	Localization	Gene ID	p-value	Fold-change
ERO1LB	chr1	ERO1-like beta ( <i>S. cerevisiae</i> )	4,6E-03	-2,00
UBXN7	chr3	UBX domain protein 7	9,3E-04	-2,00
ANKRD29	chr18	ankyrin repeat domain 29	1,3E-03	-2,00
RAB41	chrX	RAB41, member RAS oncogene family	5,1E-03	-2,01
MAP3K8	chr10	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	2,2E-03	-2,01
C4orf6	chr4	chromosome 4 open reading frame 6	1,1E-11	-2,01
DAZL	chr3	deleted in azoospermia-like	2,3E-03	-2,02
C16orf46	chr16	chromosome 16 open reading frame 46	1,1E-03	-2,02
CDHR3	chr7	cadherin-related family member 3	1,6E-03	-2,03
ZNF808	chr19	zinc finger protein 808	1,6E-05	-2,03
SCN2A	chr2	sodium channel, voltage-gated, type II, alpha subunit	5,9E-03	-2,04
SLC35G1	chr10	solute carrier family 35, member G1	4,5E-04	-2,04
ABCC2	chr10	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	1,4E-03	-2,04
P2RY6	chr11	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coDOWNled, 6	7,8E-03	-2,05
NOS1AP	chr1	nitric oxide synthase 1 (neuronal) adaptor protein	1,4E-03	-2,05
SDOWNT20HL1	chrX	sDOWNpressor of Ty 20 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )-like 1	4,5E-07	-2,05
SEMA3D	chr7	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3D	2,5E-04	-2,06
CHRNA5	chr15	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 5 (neuronal)	3,4E-04	-2,06
TFPI2	chr7	tissue factor pathway inhibitor 2	1,6E-03	-2,06
MYT1L	chr2	myelin transcription factor 1-like	1,9E-05	-2,06
UBASH3B	chr11	ubiquitin associated and SH3 domain containing B	2,2E-03	-2,06
GTSF1	chr12	gametocyte specific factor 1	1,6E-11	-2,06
AQP11	chr11	aquaporin 11	1,0E-02	-2,07
NOD2	chr16	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2	1,9E-03	-2,07
TCL1A	chr14	T-cell leukemia/lymphoma 1A	2,2E-11	-2,07
CRYBB2	chr22	crystallin, beta B2	8,2E-04	-2,07
C11orf65	chr11	chromosome 11 open reading frame 65	7,4E-04	-2,07
AOX1	chr2	aldehyde oxidase 1	1,4E-05	-2,07
CDX1	chr5	caudal type homeobox 1	4,2E-03	-2,08
GPR4	chr19	G protein-coDOWNled receptor 4	7,0E-03	-2,09
[ ... ]				
DUOX2	chr15	dual oxidase 2	1,2E-03	-10,63
ANXA10	chr4	annexin A10	8,0E-03	-10,95
NXF3	chrX	nuclear RNA export factor 3	9,5E-04	-10,95
LOC100506422	chr9	putative deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase-like protein FLJ16323	4,9E-06	-11,75
SBSN	chr19	sDOWNrabasin	6,5E-04	-11,91
STC1	chr8	stanniocalcin 1	6,0E-03	-11,95
LPAR3	chr1	lysophosphatidic acid receptor 3	6,1E-05	-12,04
GABBR2	chr9	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2	5,8E-04	-12,06
PAGE2B	chrX	P antigen family, member 2B	8,3E-03	-12,36
SPATA31D1	chr9	SPATA31 subfamily D, member 1	5,0E-08	-12,41
EREG	chr4	epiregulin	2,6E-07	-12,45
EDA2R	chrX	ectodysplasin A2 receptor	7,8E-12	-12,74
AUTS2	chr7	autism susceptibility candidate 2	5,5E-08	-14,42
DOCK8	chr9	dedicator of cytokinesis 8	1,6E-06	-14,78
DAPK1	chr9	death-associated protein kinase 1	2,1E-07	-16,39
COL4A6	chrX	collagen, type IV, alpha 6	1,7E-04	-17,61
ZNF518B	chr4	zinc finger protein 518B	3,1E-05	-18,52
STEAP4	chr7	STEAP family member 4	1,8E-03	-19,06
CERS4	chr19	ceramide synthase 4	1,6E-05	-19,67
MKX	chr10	mohawk homeobox	1,8E-03	-20,12
TBX21	chr17	T-box 21	9,5E-05	-20,83
GRIK2	chr6	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2	5,2E-08	-22,40
TMEM233	chr12	transmembrane protein 233	1,6E-05	-23,97
CNTNAP3	chr9	contactin associated protein-like 3	4,8E-06	-26,32
GPR133	chr12	G protein-coDOWNled receptor 133	4,8E-05	-27,73
WIF1	chr12	WNT inhibitory factor 1	9,8E-03	-31,07
KLHL4	chrX	kelch-like family member 4	4,9E-06	-32,82
KYNU	chr2	kynureninase	1,2E-05	-38,00
CXCL6	chr4	chemokine (C-X-C motif) ligand 6	9,5E-13	-38,51
ZNF385D	chr3	zinc finger protein 385D	1,7E-06	-53,29

**Table S2. List of down-regulated genes in resIB136 xenografts (with fold-change and p-values).**

Symbol	Localization	Gene ID	p-value	Fold-change
STC2	chr5	stanniocalcin 2	3,8E-11	810,00
LUM	chr12	lumican	1,1E-16	235,46
EFCC1	chr3	EF-hand and coiled-coil domain containing 1	3,8E-11	199,66
DCN	chr12	decorin	5,2E-11	97,60
TMEM100	chr17	transmembrane protein 100	9,1E-11	85,59
TTN	chr2	titin	7,5E-11	46,25
TNFRSF11B	chr8	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	3,8E-09	41,69
ADAMTSL1	chr9	ADAMTS-like 1	2,9E-09	34,07
TMEM2	chr9	transmembrane protein 2	9,0E-12	30,05
IGDCC3	chr15	immunoglobulin superfamily, DCC subclass, member 3	7,8E-11	26,81
LY6H	chr8	lymphocyte antigen 6 complex, locus H	2,8E-11	25,62
PROM1	chr4	prominin 1	6,7E-10	21,04
ENO3	chr17	enolase 3 (beta, muscle)	1,1E-12	17,42
F2R	chr5	coagulation factor II (thrombin) receptor	1,2E-09	16,23
SPON2	chr4	spondin 2, extracellular matrix protein	1,4E-09	14,70
TRIB3	chr20	tribbles pseudokinase 3	9,1E-08	14,33
SIPA1L2	chr1	signal-induced proliferation-associated 1 like 2	1,0E-08	14,32
MMP2	chr16	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV co	1,8E-10	14,10
TSHZ2	chr20	teashirt zinc finger homeobox 2	6,9E-09	12,71
LRRC32	chr11	leucine rich repeat containing 32	8,9E-10	12,18
COL14A1	chr8	collagen, type XIV, alpha 1	5,9E-08	12,09
NLRP1	chr17	NLR family, pyrin domain containing 1	3,0E-10	11,85
SOCS3	chr17	suppressor of cytokine signaling 3	1,1E-08	11,38
TBX2	chr17	T-box 2	9,0E-09	11,13
PIN4	chrX	protein (peptidylprolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting, 4 (parvulin)	1,5E-08	10,99
OGT	chrX	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	6,3E-15	10,72
PYGM	chr11	phosphorylase, glycogen, muscle	1,8E-09	10,62
IGJ	chr4	immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and	2,9E-10	9,98
TMTC4	chr13	transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 4	2,3E-08	9,47
RHOU	chr1	ras homolog family member U	3,6E-10	9,35
[ ... ]				
KIF20A	chr5	kinesin family member 20A	1,9E-06	5,00
FZD8	chr10	frizzled family receptor 8	2,9E-08	5,00
IL1R1	chr2	interleukin 1 receptor, type I	1,7E-10	4,98
TXNL4A	chr18	thioredoxin-like 4A	5,7E-07	4,98
CISH	chr3	cytokine inducible SH2-containing protein	3,0E-10	4,95
SEMA3A	chr7	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (s	3,3E-08	4,92
NONO	chrX	non-POU domain containing, octamer-binding	3,7E-14	4,87
PIP5K1B	chr9	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta	4,1E-09	4,87
UBE2S	chr19	ubiquitin-conjugating enzyme E2S	1,3E-07	4,86
NAP1L2	chrX	nucleosome assembly protein 1-like 2	4,0E-07	4,81
HPCAL1	chr2	hippocalcin-like 1	1,1E-06	4,72
FAM101B	chr17	family with sequence similarity 101, member B	1,4E-08	4,71
MDFI	chr6	MyoD family inhibitor	7,3E-09	4,69
FIP1L1	chr4	factor interacting with PAPOLA and CPSF1	1,7E-08	4,65
MFAP4	chr17	microfibrillar-associated protein 4	1,9E-09	4,58
PTTG1	chr5	pituitary tumor-transforming 1	6,9E-08	4,50
PPAP2B	chr1	phosphatidic acid phosphatase type 2B	2,9E-08	4,44
JUP	chr17	junction plakoglobin	1,3E-09	4,42
FBLIM1	chr1	filamin binding LIM protein 1	2,6E-07	4,41
IQGAP2	chr5	IQ motif containing GTPase activating protein 2	6,0E-10	4,41
CAMK2N1	chr1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	7,3E-08	4,40
ATXN1	chr6	ataxin 1	2,1E-07	4,40
ITGA4	chr2	integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	1,4E-08	4,37
SH3RF3	chr2	SH3 domain containing ring finger 3	5,5E-09	4,26
KBTBD11	chr8	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 11	4,0E-08	4,25
TCF21	chr6	transcription factor 21	3,1E-09	4,20
GYPC	chr2	glycophorin C (Gerbig blood group)	1,8E-09	4,19
SOCS2	chr12	suppressor of cytokine signaling 2	3,1E-09	4,19
ANGPTL1	chr1	angiopoietin-like 1	8,5E-09	4,05
TOP2A	chr17	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	6,3E-10	4,01

Table S3. List of up-regulated genes in clinical sample (with fold-change and *p-values*).

Symbol	Localization	Gene ID	p-value	Fold-change
ARHGAP20	chr11	Rho GTPase activating protein 20	1,1E-07	-4,01
PER1	chr17	period circadian clock 1	1,4E-07	-4,02
CHN2	chr7	chimerin 2	2,4E-12	-4,15
UCP2	chr11	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	3,8E-08	-4,20
CCDC6	chr10	coiled-coil domain containing 6	1,1E-08	-4,21
FRAS1	chr4	Fraser syndrome 1	4,5E-14	-4,21
ARHGAP33	chr19	Rho GTPase activating protein 33	8,6E-09	-4,22
GPD1L	chr3	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like	5,0E-10	-4,22
CLIP3	chr19	CAP-GLY domain containing linker protein 3	7,0E-08	-4,22
PTPRF	chr1	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	2,6E-07	-4,23
PLXNA2	chr1	plexin A2	6,4E-11	-4,24
SCG5	chr15	secretogranin V (7B2 protein)	7,2E-08	-4,30
SOD3	chr4	superoxide dismutase 3, extracellular	3,6E-10	-4,32
ATP2B4	chr1	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 4	6,5E-10	-4,32
MAGI3	chr1	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 3	1,4E-07	-4,38
DDX26B	chrX	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 26B	2,1E-07	-4,38
HAS3	chr16	hyaluronan synthase 3	3,6E-11	-4,41
HADH	chr4	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	5,5E-08	-4,44
NCALD	chr8	neurocalcin delta	4,8E-08	-4,47
NISCH	chr3	nischarin	9,6E-10	-4,47
FNIP2	chr4	folliculin interacting protein 2	3,8E-06	-4,57
SAMD11	chr1	sterile alpha motif domain containing 11	6,3E-09	-4,58
SETD7	chr4	SET domain containing (lysine methyltransferase) 7	1,7E-09	-4,64
SCD	chr10	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	7,2E-09	-4,75
SLIT3	chr5	slit homolog 3 (Drosophila)	3,5E-08	-4,76
FBXO41	chr2	F-box protein 41	9,0E-08	-4,80
PRRT2	chr16	proline-rich transmembrane protein 2	8,8E-10	-4,94
CRMP1	chr4	collapsin response mediator protein 1	1,6E-07	-4,95
ATP9A	chr20	ATPase, class II, type 9A	4,4E-10	-4,95
SULF2	chr20	sulfatase 2	7,5E-08	-4,96
[ ... ]				
PBX3	chr9	pre-B-cell leukemia homeobox 3	2,6E-09	-8,20
CD44	chr11	CD44 molecule (Indian blood group)	1,0E-10	-8,30
CFI	chr4	complement factor I	1,6E-08	-8,46
ENPP4	chr6	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4 (putative)	2,6E-09	-8,63
MID1	chrX	midline 1 (Opitz/BBB syndrome)	1,2E-12	-8,77
SOGA2	chr18	SOGA family member 2	4,1E-09	-9,23
CLU	chr8	clusterin	7,7E-15	-9,35
ABHD2	chr15	abhydrolase domain containing 2	2,9E-10	-9,52
FILIP1	chr6	filamin A interacting protein 1	2,7E-10	-9,85
DOPEY2	chr21	dopey family member 2	2,2E-12	-9,90
PDE5A	chr4	phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	1,9E-11	-10,13
CSRP2	chr12	cysteine and glycine-rich protein 2	9,1E-11	-10,35
REM1	chr20	RAS (RAD and GEM)-like GTP-binding 1	5,1E-11	-10,39
EFEMP1	chr2	EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	1,9E-09	-10,42
PDE3B	chr11	phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited	4,2E-08	-10,55
KIAA1244	chr6	KIAA1244	3,6E-09	-10,66
SYTL2	chr11	synaptotagmin-like 2	4,5E-15	-11,15
BMP2K	chr4	BMP2 inducible kinase	1,2E-12	-11,36
ATP2A3	chr17	ATPase, Ca++ transporting, ubiquitous	6,0E-09	-12,05
AFMID	chr17	arylformamidase	1,1E-08	-12,20
TFAP2A	chr6	transcription factor AP-2 alpha (activating enhancer binding protein 2 alpha)	1,2E-08	-12,48
LPHN1	chr19	latrophilin 1	1,9E-09	-14,74
MICALL2	chr7	MICAL-like 2	5,7E-09	-14,92
DOCK9	chr13	dedicator of cytokinesis 9	2,3E-14	-15,27
ALDH1A3	chr15	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	4,1E-12	-15,69
FGL2	chr7	fibrinogen-like 2	8,5E-10	-17,30
PRELP	chr1	proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein	5,4E-09	-17,42
VCAN	chr5	versican	6,4E-12	-17,65
ANK2	chr4	ankyrin 2, neuronal	3,8E-09	-21,66
TYRP1	chr9	tyrosinase-related protein 1	3,5E-14	-304,36

**Table S4. List of down-regulated genes in clinical sample (with fold-change and p-values).**



# **DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES**

Les travaux de Hernando ont montré que la voie de signalisation PI3K/mTOR joue un rôle majeur dans la biologie des léiomyosarcomes (Hernando et al., 2007). En effet, des souris dont le gène *PTEN* a été inactivé par mutagenèse dirigée dans des cellules du muscle lisse ont développé des léiomyosarcomes très rapidement et avec une incidence élevée (> 80 %). Nos résultats confirment l'importance de cette voie de signalisation dans la prolifération et la survie des cellules de LMS. L'analyse d'échantillons tumoraux humains a permis par ailleurs de montrer que l'activation de la voie PI3K/mTOR est par ailleurs fréquente dans les LMS et associée à un impact pronostique (Setsu et al., 2012). Les différents inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR que nous avons utilisé au cours de ce travail ont montré une activité antitumorale *in vitro* et *in vivo*. Les agents tels que le BEZ235 qui inhibent la voie en amont et en aval d'AKT n'entraînent pas de levée de la boucle de rétrocontrôle négatif mTORC1-S6K-IRS1 classiquement observée avec les inhibiteurs de mTOR tels que l'évérolimus et qui explique leur activité clinique limitée (Keniry and Parsons, 2011). Ainsi, alors que le BEZ235 induit l'apoptose cellulaire dans les différents modèles que nous avons analysés, l'évérolimus n'a aucun effet. L'activité antitumorale du BEZ235 que l'on a observée en comparaison de celle du BKM120 (inhibiteur spécifique de la kinase PI3K) était par ailleurs attendue dans la mesure où les inhibiteurs doubles cibles ont été développés pour être plus actifs en particulier dans les tumeurs comme les léiomyosarcomes qui présentent des altérations de la voie de signalisation en aval de PI3K et en amont de mTOR telles que les pertes de *PTEN* (Dienstmann et al., 2014) mais aussi dans les tumeurs avec une mutation activatrice de *PI3KCA* (Elkabets et al., 2013).

Plusieurs inhibiteurs ciblant simultanément les kinases PI3K et mTOR (GSK2126458, GDC-0980, BEZ235, PF-04691502) ont été ou sont en cours de développement dans divers types tumoraux. Des réponses thérapeutiques prolongées ont été observées y compris chez des patients dont la maladie avait progressé précédemment sous inhibiteurs de mTOR (Dolly et al., 2016). Toutefois, la majorité des patients ne répondent pas aux traitements (résistance primaire) ou voient leur maladie évoluer après une réponse thérapeutique initiale (résistance secondaire).

### **Résistance primaire aux inhibiteurs double cible de la voie PI3K/mTOR**

Il a été établi que la voie PI3K/mTOR est capable d'interagir avec d'autres voies de signalisation en particulier la voie RAS/MAPK qui est fortement impliquée dans la prolifération cellulaire. En effet, l'activation constitutive de la voie RAS/MAPK suite à une mutation de la protéine RAS est corrélée à une inactivation de la voie PI3K/mTOR (Hayashi et al., 2008). De même la phosphorylation de RAF par AKT inhibe la voie RAS/MAPK (Zimmermann and

Moelling, 1999). L'ensemble de ces résultats montre que l'activation de la voie PI3K/mTOR engendre l'inactivation de la voie RAS/MAPK et inversement. Au cours de notre travail, nous avons constaté que l'inhibition de la voie PI3K/mTOR par le BEZ235 induit dans les lignées cellulaires de LMS une activation compensatrice de la voie RAS/MAPK qui représenterait donc un mécanisme potentiel de résistance primaire. De nombreuses études ont montré un effet bénéfique de l'inhibition simultanée des deux voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire. Nous avons ainsi observé un effet synergique de la combinaison du BEZ235 avec un inhibiteur de MEK (GSK1120212) *in vitro* et *in vivo*. Des résultats similaires ont été rapportés dans les ostéosarcomes (Zhu et al., 2015b), les cancer de la thyroïde (ElMokh et al., 2017), du cerveau (Wu et al., 2017b), du sein (Saini et al., 2013) ou encore du côlon (Temraz et al., 2015). L'association d'inhibiteur double cible PI3K et mTOR avec un inhibiteur de la voie RAS/MAPK pourrait toutefois poser des problèmes de tolérance clinique dont il faudra tenir compte (Shimizu et al., 2012). Par ailleurs, des travaux préliminaires seront nécessaires pour identifier, parmi les patients atteints de LMS, ceux qui sont les plus susceptibles de bénéficier d'une telle stratégie. Nous n'avons en effet pas étudié la fréquence de l'activation de ces voies de signalisation dans des échantillons humains de léiomyosarcomes. Cependant, nous posons l'hypothèse qu'une inhibition double cible de PI3K et mTOR avec un inhibiteur de la voie RAS/MAPK serait plus pertinente dans les cas exprimant en immunohistochimie p-AKT et p-S6RP comme le suggèrent des travaux précliniques récents menés dans les LMS utérins (Cuppens et al., 2017).

### **mTORC2, quels rôles dans la cellule tumorale ?**

Au-delà de la mise en évidence d'une activation paradoxale de la voie RAS/MAPK lors de l'inhibition simultanée des kinases PI3K et mTOR et de son impact thérapeutique potentiel, nous avons cherché à mettre en évidence les mécanismes moléculaires sous-jacents. De façon surprenante, ni l'inhibition de mTOR par l'évérolimus, ni l'inhibition de la protéine PI3K par le BKM-120 ne produit une activation compensatrice de la voie RAS/MAPK. Plus intéressant encore, une combinaison des composés BKM-120 et évérolimus induit une activation de la voie similaire à celle obtenue avec le BEZ235. Ces résultats ont soulevé l'existence d'une boucle de rétrocontrôle négatif exercé par mTORC2 sur la voie RAS/MAPK dans les léiomyosarcomes. Alors que le complexe mTORC1 et ses fonctions ont bien été établis, les modes de régulation et le rôle de mTORC2 dans la tumorigenèse sont encore très peu connus.

Plusieurs études suggèrent que la signalisation des facteurs de croissance incluant la voie PI3K/mTOR, la voie Wnt, la voie Hippo et la voie Notch favoriserait la liaison des ribosomes sur mTORC2 pour promouvoir son activité kinase (Zinzalla et al., 2011). La protéine S6K1 inhibe également le complexe mTORC2 ainsi que sa fonction kinase sur la sérine 473 d'AKT lorsque la voie PI3K/mTOR est activée (Sarbasov et al., 2005). Il y a encore quelques années, la seule fonction connue du complexe mTORC2 était d'assurer la stabilité et l'activation maximale de la protéine AKT afin de réguler mTORC1. Plus tard, un modèle de gliome chez la drosophile a permis d'identifier mTORC2 comme étant indispensable à la formation de tumeurs et a suggéré un rôle majeur de mTORC2 dans le cancer (Read et al., 2009). D'autres études ont depuis montré des rôles du complexe mTORC2 indépendamment de la voie PI3K/mTOR. En effet, mTORC2 a été impliqué dans la croissance cellulaire, la survie mais aussi la résistance aux chimiothérapies en interagissant avec la voie NF- $\kappa$ B ou en reprogrammant l'activité métabolique de la cellule (Tanaka et al., 2011; Weiler et al., 2014).

Pour confirmer ce rôle de mTORC2 dans la régulation de l'activité de la voie RAS/MAPK dans les léiomyosarcomes, nous avons utilisé des ARN interférents contre la sous-unité RICTOR afin d'inactiver le complexe mTORC2. Nous avons alors observé une activation de la voie RAS/MAPK similaire à celle observée avec l'utilisation du BEZ235 confirmant ainsi le rôle indépendant de la voie PI3K/mTOR du complexe mTORC2. Ces résultats sont en accord avec le fait que mTORC2 lui-même pourrait être un oncogène important dans le cancer (Cheng et al., 2015). Par ailleurs, une étude dans le cancer du pancréas a identifié le même mécanisme que celui révélé dans notre étude (Soares et al., 2015). Si les mécanismes biochimiques à l'origine de ce phénomène restent à élucider, il apparaît que le développement et l'évaluation d'inhibiteurs spécifiques du complexe mTORC2 dans les léiomyosarcomes mais aussi dans d'autres modèles de cancer pourraient apporter de nouvelles informations sur le rôle de mTORC2 dans le cancer et sur la plasticité des deux voies de signalisations majeures étudiées en cancérologie.

### **Résistance secondaire au ciblage de la voie PI3K/mTOR : rôle des cellules souches cancéreuses**

Deux modèles conceptuels de l'origine et de la progression tumorale ont été proposés pour rendre compte de l'hétérogénéité cellulaire d'une tumeur. Le modèle stochastique où toutes les cellules tumorales possèdent une capacité proliférative élevée et le modèle hiérarchique selon lequel le cancer provient de la transformation d'une petite fraction de la

population tumorale, composée de cellules souches cancéreuses (Dick, 2008; Heppner, 1984). Dans le premier modèle, l'hétérogénéité tumorale est attribuée à la différenciation cellulaire mais aussi à des variations génétiques et épigénétiques intra-clonales tandis que dans le second modèle, elle résulterait d'un arrêt de différenciation des cellules souches à différents stades. Ainsi, les cellules souches cancéreuses constitueraient une petite partie de la population des cellules tumorales et seraient nécessaires et suffisantes pour former une tumeur. Les caractéristiques majeures de ces cellules initiatrices de cancer sont l'auto-renouvellement et la capacité de résister aux chimiothérapies (Mountford, 2008). Cependant, l'isolement des CSCs est difficile. En ne prenant que le cas des sarcomes, seules des techniques de caractérisation (détection des marqueurs de surface CD133 ou CD117) et d'enrichissement (isolement de population ALDH positive) ont été utilisées. En effet, dans des modèles d'ostéosarcomes, de sarcomes d'Ewing et de rhabdomyosarcomes, les cellules exprimant le marqueur de surface CD133 avaient la capacité de former des tumorosphères et exprimaient des marqueurs souches tels que OCT3/4, NANOG ou SOX2 (Suvà et al., 2009; Tirino et al., 2011; Walter et al., 2011). Dans les ostéosarcomes et le sarcome d'Ewing, ces cellules possédaient aussi une activité importante de l'enzyme ALDH (Awad et al., 2010; Wang et al., 2011).

Dans notre étude des mécanismes de résistance secondaire à une inhibition double cible de PI3K et mTOR, une exposition prolongée (48 semaines) des lignées cellulaires de léiomyosarcomes au BEZ235 a conduit à l'émergence d'une petite population cellulaire que l'on a décrite comme proche d'une population souche. En effet, par analyse transcriptomique des tumeurs résistantes au BEZ235, nous avons détecté la surexpression de nombreux gènes de cellules souches dont *ALDH* et *SOX2*. A l'image de différentes études dans les sarcomes d'Ewing et les ostéosarcomes, nous avons aussi détecté une fraction cellulaire ALDH positive dans nos lignées cellulaires résistantes. Après avoir isolé cette fraction cellulaire par une technique de triage en cytométrie en flux, nous avons montré les capacités de ces cellules à s'auto-renouveler et à résister au médicament, deux caractéristiques majeures des cellules souches cancéreuses.

L'existence des CSCs a d'importantes conséquences thérapeutiques puisqu'elles sont responsables du développement tumoral, de l'apparition des métastases, des résistances aux chimiothérapies et des récives. Difficiles à éradiquer, les CSCs font l'objet de nombreuses études pour comprendre comment elles peuvent résister aux agents anti-cancéreux. Plusieurs raisons ont été avancées : une expression élevée de pompes à efflux, une forte capacité de réparation de l'ADN et une capacité à se diviser lentement et à entrer en quiescence (Bao et al., 2006; Donnenberg and Donnenberg, 2005). Dès lors, quelles approches thérapeutiques

pouvons-nous utiliser pour cibles ces cellules souches cancéreuses ? A ce jour, aucune cible idéale n'a été mise en évidence mais des thérapies pertinentes ont été avancées. La première, appelée thérapie d'élimination ou de prévention, repose sur l'élimination des CSCs par une approche antigénique ou épigénétique. Dans le cancer du sein et les leucémies myéloïdes aigues, des anticorps monoclonaux dirigés contre le CD44 ont prouvé leurs efficacités dans la réduction de la population de ces cellules souches tumorales (Balic et al., 2006; Jin et al., 2006). Des anticorps monoclonaux dirigés contre le marqueur de surface CD133 ont également montré des résultats similaires dans le cancer du foie et de l'estomac (Smith et al., 2008). La seconde thérapie, une thérapie de différenciation, consiste à forcer la différenciation des CSCs qui est bloquée dans de nombreuses tumeurs. Par exemple, la sortie de quiescence de ces cellules souches tumorales par l'administration d'acide tout trans-rétinoïque (ATRA) a montré son efficacité dans les leucémies promyélocytaires (Tallman et al., 2002).

La modification post-traductionnelle des histones est un facteur de régulation épigénétique important. Ces protéines peuvent être acétylées (activées), méthylées ou ubiquitinylées (dégradées) par des enzymes du complexe Polycomb. EZH2 est un inhibiteur de la transcription et un régulateur de la différenciation cellulaire par méthylation de la lysine 27 de l'histone 3. EZH2 est capable de réguler la balance auto-renouvellement / différenciation cellulaire des cellules souches (O'Carroll et al., 2001). Nous avons donc supposé que l'EPZ011989, un inhibiteur d'EZH2, pouvait diminuer la résistance mise en évidence dans nos lignées et *in vivo*. D'une part, nous avons montré que l'inhibition d'EZH2 provoquait une diminution de la population cellulaire souche dans nos lignées de LMS résistantes au BEZ235. D'autre part, cette inhibition permettait de retrouver une activité cytostatique du BEZ235. Enfin, l'utilisation de ce composé *in vivo* nous a permis de sensibiliser de nouveau les tumeurs résistantes au BEZ235. Outre ces résultats précliniques, nous avons également mis en évidence à travers cette étude l'existence d'une population cellulaire souche dans des tumeurs de patients résistants à un inhibiteur de PI3K $\alpha$ .

La confirmation du rôle des CSCs dans la résistance aux inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR nécessiterait toutefois l'étude d'une plus large série d'échantillons tumoraux prélevés avant traitement et lors de la résistance secondaire. Par ailleurs, la confirmation de la nature « souche » de la population de cellules que nous avons identifiée nécessitera des études de tumorigénicité *in vivo*. Néanmoins, nos résultats confortent l'idée d'établir des stratégies thérapeutiques visant à cibler les propriétés spécifiques des cellules souches afin d'améliorer l'efficacité des inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR dans les léiomyosarcomes et indiquent que

dans ce cadre, une approche épigénétique peut être particulièrement intéressante comme cela a été suggéré dans d'autres modèles (Koren and Bentires-Alj, 2017).

# **PUBLICATIONS ANNEXES**



**MDM2 antagonists synergize with PI3K/mTOR inhibition in well-differentiated/dedifferentiated liposarcomas.**

Audrey Laroche-Clary<sup>1,2</sup>, Vanessa Chaire<sup>1,2</sup>, Marie-Paule Algeo<sup>1</sup>, Marie Karanian<sup>3</sup>, Benjamin Fourneaux<sup>1,2</sup>, Antoine Italiano<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Université de Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>2</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1218, Institut Bergonié, Bordeaux, France

<sup>3</sup> Department of Medical Oncology, Institut Bergonié, Bordeaux, France

Oncotarget, 2017. Doi: 10.18632/oncotarget.16345

## MDM2 antagonists synergize with PI3K/mTOR inhibition in well-differentiated/dedifferentiated liposarcomas

Audrey Laroche<sup>1,2</sup>, Vanessa Chaire<sup>1,2</sup>, Marie-Paule Algeo<sup>1</sup>, Marie Karanian<sup>3</sup>, Benjamin Fourneaux<sup>1,2</sup> and Antoine Italiano<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Université de Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>2</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut Bergonié, Bordeaux, France

<sup>3</sup> Department of Medical Oncology, Institut Bergonié, Bordeaux, France

**Correspondence to:** Antoine Italiano, **email:** a.italiano@bordeaux.unicancer.fr

**Keywords:** MDM2, CDK4, well-differentiated/dedifferentiated liposarcomas

**Received:** December 28, 2016

**Accepted:** January 11, 2017

**Published:**

### ABSTRACT

**Background:** Well-differentiated/dedifferentiated liposarcoma (WDLPS/DDLPS) are characterized by a consistent amplification of the MDM2 gene. The PI3K/AKT/mTOR pathway has been suggested to play also an important role in their tumorigenesis. Our goal was to determine whether combined MDM2 and PI3K/AKT/mTOR targeting is associated with higher anti-tumor activity than single agent alone in preclinical models of WDLPS/DDLPS.

**Methods:** WDLPS/DDLPS cells were exposed to RG7388 (MDM2 antagonist) and BEZ235 (PI3K/mTOR dual inhibitor) after which apoptosis and signaling/survival pathway perturbations were monitored by flow cytometry and Western blot analysis. Xenograft mouse models were used to assess tumor growth and animal survival. Western blotting, histopathology, and tumor volume evolution were used for the assessment of treatment efficacy.

**Results:** The PI3K/AKT/mTOR was upregulated in up to 81% of the human WDLPS/DDLPS samples analysed. Treatment with RG7388 and BEZ235 resulted in a greater tumor activity than either drug alone with a significant difference in terms of cell viability after 72h of treatment with RG-73888 alone, BEZ235 alone and a combination of both agents. Consistent with these observations, we found a significant increase in apoptosis with the combination *versus* the single agent treatment alone. We then analysed the *in vivo* antitumor activity of RG7388 and BEZ235 in a xenograft model of DDLPS. The combination regimen significantly reduced tumor growth rate in comparison with single agent alone.

**Conclusions:** Our results represent the first *in vivo* evidence of synergy between MDM2 and PI3K/AKT/mTOR antagonists and represent a strong rationale to evaluate the therapeutic potential of such a combination in WDLPS/DDLPS.

### INTRODUCTION

Accounting for up to 25% of all sarcomas in adults [1], liposarcoma (LPS) is the most common soft tissue sarcoma (STS). Liposarcomas can be divided into three categories on the basis of their cytogenetic characteristics: myxoid/round cell LPS, pleomorphic LPS and well-differentiated and dedifferentiated LPS (WDLPS/DDLPS). WDLPS represent more than 40% of all diagnosed LPS and are subdivided in three main histological subtypes: adipocytic, sclerosing and inflammatory. The three main

locations are the limbs (50%), the retroperitoneum (30%) and the paratesticular area (20%). Although these tumors do not metastasize, retroperitoneal and paratesticular ones are associated with a high risk of local recurrence (up to 90%) and a high a risk of dedifferentiation (up to 20%) [2, 3] whereas these risks are lower for tumors located in the limbs [4].

DDLPS are biphasic neoplasms occurring in the same age group as WDLPS, with one component being a WDLPS and the other a non lipogenic sarcoma of variable histological grade. About 90% of DDLPS arise *de novo*,

while 10% occur in recurrence. This histological subtype is found mostly in the retroperitoneum [3, 5] and has a more aggressive behavior than WDLPS with an estimated 5-year disease-specific-survival of 44% *versus* 93% [6]. The local recurrence rate for retroperitoneal tumors can reach 80% and distant metastatic relapse is observed in up to 30% of cases [2, 7].

Surgery is the cornerstone of the primary management of WDLPS/DDLPS. Resection with R0 margin status is an achievable goal for WDLPS/DDLPS located in the limbs but is more challenging for retroperitoneal tumors for obvious anatomical reasons. Therefore, retroperitoneal tumors are associated with a higher rate of recurrence.

Systemic therapy is the most suitable approach for patients with advanced/unresectable disease. However, we have reported that the role of conventional chemotherapy such as doxorubicin, ifosfamide or trabectedin in this setting is very limited with an objective response rate of 12% and a median PFS of only 4.6 months respectively [8]. New therapeutic options are therefore urgently needed.

We and others have shown that WDLPS/DDLPS cells contain supernumerary ring or giant marker chromosomes composed of highly amplified sequences from the 12q14-15 chromosomal region [1, 9] which contain consistently the *MDM2* (12q15) and *HMGA2* (12q14.3) genes. We have also shown that the *CDK4* gene (12q14.1) belongs to a distinct amplicon which is inconsistent but present in up to 90% cases [9].

Recently, a class of imidazoline compounds has been identified as potent and selective inhibitors of the TP53-MDM2 interaction [10]. These molecules, termed nutlins, interact specifically with the TP53-binding pocket of MDM2 and thus release TP53 from negative control. Treatment of cancer cells expressing wild type TP53 with nutlins stabilizes TP53 and activates the TP53 pathway leading to activation of TP53 target genes, cell cycle arrest, apoptosis and/or senescence. We have recently shown that the nutlins activates the TP53 pathway and decreases cell proliferation in patients with WDLPS/DDLPS [11]. However, only few patients had objective response or long-term disease stability [12].

Loss of PTEN and activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway was suggested to be involved in WDLPS/DDLPS tumorigenesis [13-14]. Interactions between the TP53 and PI3K/AKT pathways play a significant role in the determination of cell death/survival [15-19]. Indeed, the TP53-MDM2 loop is embedded in a larger network that includes AKT, a gene associated with cell survival signaling pathways. The significance of this TP53-AKT network (Supplementary Figure 1) is highlighted by the following facts: it involves two known tumor suppressor genes (TP53 and PTEN), and two oncogenes (MDM2 and AKT) [15-19]. Importantly, the TP53-AKT network is composed of two feedback loops: the mutual antagonism

between TP53 and AKT which is a positive feedback loop (Figure 1), and the TP53-MDM2 negative loop (Supplementary Figure 1).

We report here a study which aims at determining whether targeting both MDM2-TP53 interaction and PI3K/AKT/mTOR pathways is associated with synergistic activity in WDLPS/DDLPS.

## RESULTS

### Aberrant PI3K/AKT/mTOR pathway activation in primary human well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas

To test whether the PI3K/AKT/mTOR pathway is altered in human WDLPS/DDLPS, we performed immunohistochemical analysis to evaluate the expression of PTEN, a negative regulator of AKT, and of p-S6K, one crucial downstream target of mTORC1 on clinical specimens from 37 patients with well-differentiated (n=10) and dedifferentiated liposarcomas (n=27). These studies demonstrated loss of PTEN expression in 2 WDLPS (20%) and 16 DDLPS (59%) and evidence of S6 activation in 7 WDLPS (70%) and 21 DDLPS (81%) (Supplementary Figure 2). We did not observe any evidence of PTEN loss or S6 phosphorylation in lipomas (data not shown). By using comparative genomic hybridization analysis, we found that the *PTEN* gene was deleted in only 2 cases out of 24 (8%) (data not shown).

### RG7388 activates the TP53 pathway, induces significant proliferation inhibition, cell-cycle arrest and apoptosis in DDLPS cell lines

As predicted by the mechanistic model of TP53 regulation, the nutlin compound RG7388 inhibited significantly the proliferation of 5 out of 11 STS cell lines with no TP53 mutations as assessed by Sanger sequencing (IC50: 2-50 nM), but not of the 6 out of 11 cell lines with TP53 mutations (Figure 1A). The most sensitive cell lines were the DDLPS cell lines IB111, IB115 characterized by an amplification of the *MDM2* gene and the extraskeletal osteosarcoma cell line IB128 with no alteration of the *MDM2* gene copy numbers. In agreement with the mechanism of action of nutlins, treatment of the DDLPS cell lines with RG7388 showed an accumulation of the TP53 protein and its targets, P21 and MDM2, as revealed by Western blotting (Figure 1B) One of the main cellular functions of activated TP53 is blocking cell cycle progression in the G1 and G2 phase. Treatment of exponentially proliferating IB111 and IB115 DDLPS cell lines with RG7388 for 48 hours led to a dose-dependent cell cycle block in G2/M phase (Figure 1C). One of the

other main functions of activated TP53 is induction of apoptosis. Exposure of exponentially proliferating IB111 and IB115 DDLPS cell lines to RG7388 for 72 hours led to the induction of apoptosis in a dose-dependent manner as revealed by Annexin V assay (Figure 1D). The effects on cell cycle and apoptosis were not observed in the myxofibrosarcoma IB114 and leiomyosarcoma IB136 cell lines used as controls (Figure 1C and 1D).

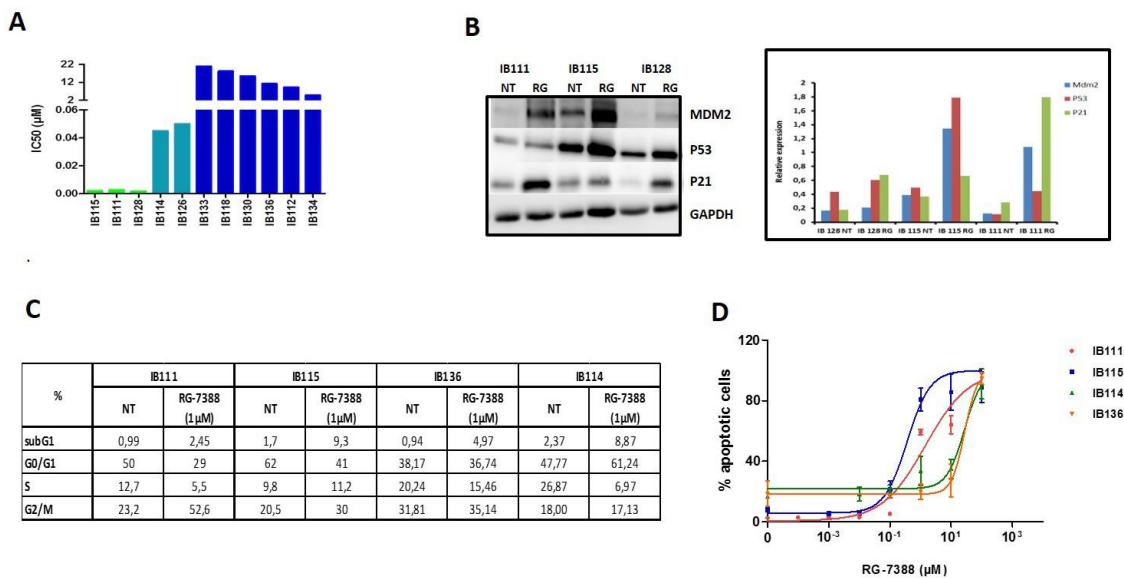
**NVP-BEZ235 inhibits PI3K/mTOR signaling and efficiently induces proliferation inhibition, and apoptosis in DDLPS cell lines**

We confirmed that the IB115 and IB111 DDLPS cell lines exhibited high baseline levels of PI3K/AKT/ mTOR signaling measured by p-AKT, p4EBP1, pMTOR and phosphoS6 (Figure 2A and 2B). Treatment of the IB115 and IB111 cells with NVP-BEZ235 was able to inhibit significantly the phosphorylation of Akt, Ser2448 mTOR, Ser240/244 S6 and 4EBP1 (Figure 2A and 2B). Correspondingly, 10<sup>-4</sup> to 100 μmol/L BEZ235 decreased DDLPS cell growth in a concentration-dependent manner, (Figure 2C). Exposure of exponentially proliferating DDLPS cell lines to for 72 hours also led to the induction of apoptosis in a dose-dependent manner as revealed by Annexin V assay (Figure 2D and 2E). Cell-cycle analysis

demonstrated no cell-cycle arrest at G0-G1 following 48 hours of exposure to increase doses of BEZ-235 (data not shown).

**Combined inhibition of PI3K/AKT/mTOR and MDM2 enhances growth inhibition and apoptosis of DDLPS cells**

Because the high level of PI3K/AKT/mTOR signaling can affect the anti-survival and pro-apoptotic effects of RG7388, we investigated whether inhibition of this pathway by BEZ235 would increase the response DDLPS cell lines to RG7388. As shown in Figure 3A and 3B, combination of both drugs after 72h exposure is synergistic in DDLPS cells (IB111 and IB115). Consistent with these observations, a quantitative confirmatory apoptosis assay using flow cytometry revealed that apoptosis induction was significantly higher when DDLPS cells were treated with the combination of RG7388 and BEZ235 than with single agent alone (Figure 3C). TP53 has been shown to inhibit the PI3K/AKT/mTOR pathway. To understand the mechanisms involved in the synergy between RG7388 and BEZ235 we analysed their impact on TP53 and PI3K/AKT/mTOR signalling. BEZ235 induced only a moderate increase of TP53 protein expression (Figure 4A). We found also that the PI3K/



**Figure 1:** A. IC<sub>50</sub> (μM) of nutlin (RG-7388) for 11 soft tissue sarcoma cells, IB111, IB115, IB128, IB114 and IB126 are P53 wild-type, the other cell lines are P53 mutated. MDM2 is only amplified in IB115 and IB111 cells. B. Sensitive cells untreated or exposed to IC<sub>50</sub> of RG-7388 (RG) were immunoblotted for MDM2, TP53 and P21 expression and quantification of the immunoblots C. Cell cycle profile before and after treatment with 1μM of RG7388 analyzed by PI incorporation and flow cytometry after 48h of treatment D. Effect of RG7388 on apoptosis in four cell lines: 2 very sensitives to RG7388 (IB111 and IB115), one with intermediate sensitivity (IB114) and one resistant cell line (IB136).

AKT/mTOR pathway remained active after treatment with RG7388 despite induction of TP53 (Figure 4B). However, the combination of both drugs induced a strong concomitant induction of TP53, P21 and inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway.

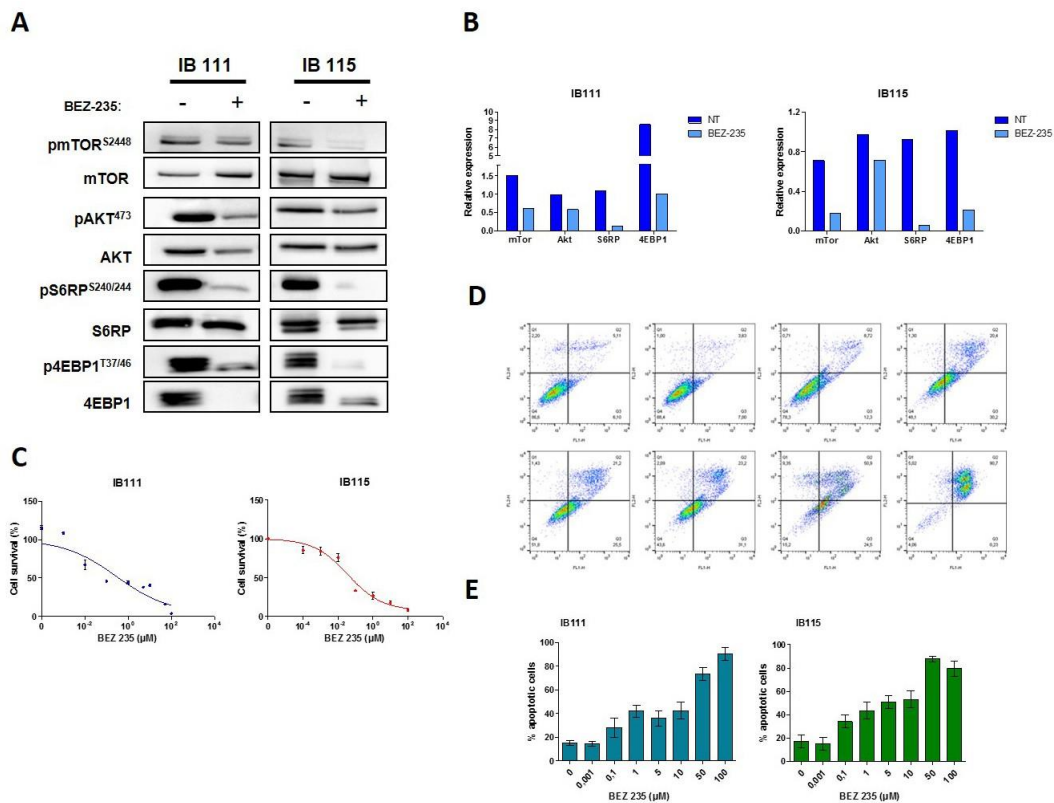
**In vivo Activity of RG7388 and BEZ235 against tumor growth**

The *in vivo* antitumor activity of NVP-BEZ235 and RG7388 was then analysed in a xenograft model from the IB115 cell line. When tumors were measurable and reached an average volume of 0.1 cm<sup>3</sup>, the animals were treated with RG7388 alone, NVP-BEZ235 alone and a combination of both. The combination regimen significantly reduced tumor growth rate and time to progression in comparison with single agent alone (Figure 5A and 5B). No significant changes in the weight of the tumor-bearing mice were observed after treatments with

NVP-BEZ235 (data not shown). Specific effects of NVP-BEZ235 on the PI3K/Akt pathway *in vivo* were confirmed by immunohistochemistry on tumor tissues at the end of treatments by using immunohistochemical evaluation of p-S6RP<sup>ser240/244</sup> in controls or in tumors derived from mice treated with the different regimens. (Figure 5C). No significant difference in staining intensity was observed when combining BEZ 235 and RG7358 *versus* BEZ235 as a single agent. (Figure 5C). Consistently with the cytostatic effects induced by NVP-BEZ235, KI-67 immunostaining was also significantly reduced following treatment with the combination *versus* single agent inhibitor (Figure 5D).

**DISCUSSION**

Well-differentiated/dedifferentiated liposarcomas are the most frequent subtypes of STS and are characterized by a specific amplification of MDM2 (12q14-15) [1, 8]. Stimulating the tumour suppressor activity of wildtype

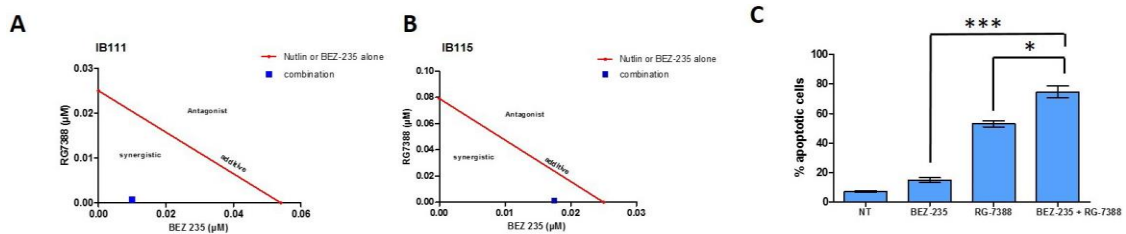


**Figure 2:** **A**. Representative blots of total and phosphorylated proteins of PI3KCA/AKT/mTOR pathway in the DDLPS cell lines untreated or exposed to BEZ-235 at 0,1μM are shown, each experiment was repeated twice **B**. Quantification of the Western blots. **C**. Effect of BEZ-235 on DDLPS cells proliferation (IB111 and IB115), the IC50 are respectively 0,3μM and 0,036μM **D**. Effect of BEZ-235 on cell death using FITC annexin-V and propidium iodide assay for IB111 cell line. **E**. quantification of apoptosis in DDLPS cells untreated or exposed to increasing doses of BEZ-235.

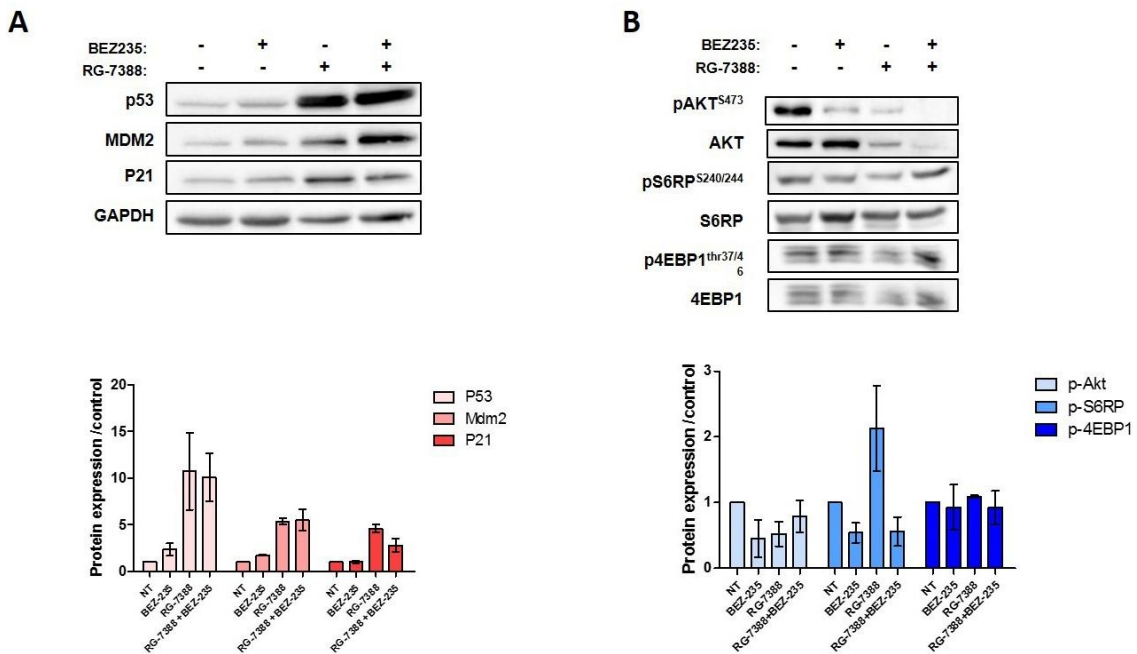
TP53 protein has long been shown to eradicate tumour cells in animal models, which makes the molecule an attractive therapeutic target for drug development. Inhibition of the MDM2TP53 interaction with synthetic molecules might therefore lead to the accumulation of active TP53 followed by the death of the tumour cells from apoptosis as shown *in vitro* [10]. Nutlins represent a class of antagonists that inhibited the MDM2-TP53 complex and first described in 2004 [10]. This class of agents can disrupt the MDM2-TP53 interaction by binding a well-defined hydrophobic cleft of MDM2 which represented the binding site for TP53, liberating functional TP53 [10]. There are only limited pre-clinical data regarding the

anti-tumor activity of nutlins in sarcomas [20-22]. Most of them were based on bone sarcoma cell lines and not on STS models. We have recently shown that MDM2 antagonist activates the TP53 pathway and decreases cell proliferation in patients with MDM2-amplified liposarcoma. However, in this study, 25% of patients displayed primary resistance [11].

The combination of genotoxic drugs with nongenotoxic nutlin has been reported to synergistically activate TP53 functions, paving the way for the potential use of nutlin in combinatorial drug therapy [23, 24]. Ohnstad and all investigated *in vitro* the effect of Nutlin-3 combination with the current cytotoxic drugs (e.g.



**Figure 3: Isobologram representation for the IB111. A. and IB115 B.,** cell lines, the dots located lower left, on the diagonal line, or upper right indicate synergism, additivity, and antagonism, respectively, combination index was calculated and CI = 0,22 and 0,71 respectively. **C.** quantification of apoptotic cells after 72h of treatment with BEZ-235 or nutlin alone or with the two drugs in combination. Apoptosis induction was analysed using FITC anexin-V and propidium iodide assay in IB115 cells.



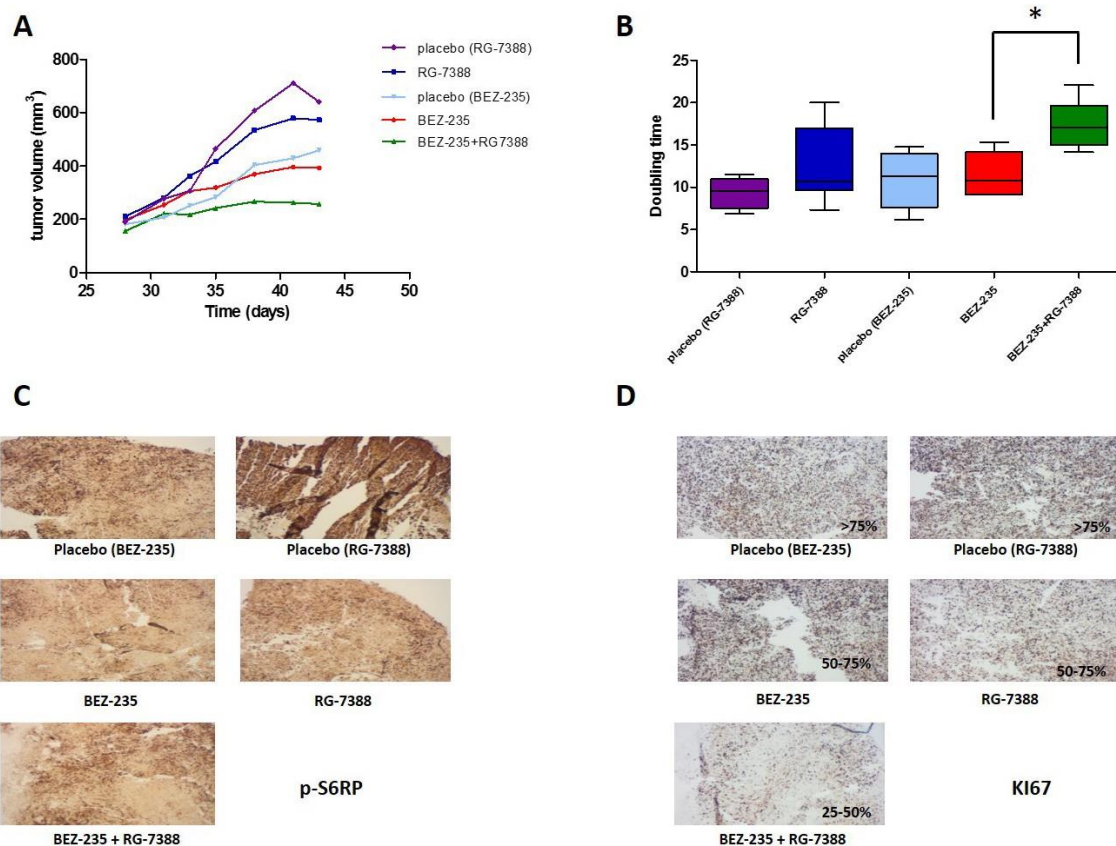
**Figure 4: A.** Western blot analysis of P53 proteins pathway in IB115 cell line untreated or exposed to BEZ-235 and/or RG-7388 at IC50 **B.** Western blot analysis of PI3K pathway protein phosphorylated and total in IB115 cells treated with drug alone or in combination at IC50. Each experiment was repeated 3 times.



Doxorubicin, Cisplatin and Methotrexate) on sarcoma cells [25]. Among the drug tested, only doxorubicin is used in the management of WDLPS/DDLPS. The authors found a synergy that supported the development of this combination in the clinics. We have indeed recently reported through a phase 1 study that combination therapy with doxorubicin and the nutlin compound RG7112 resulted in an apparent potentiation of TP53 activation in an unselected population of patients with advanced STS [26]. However, due to the toxicity profile of doxorubicin, this combination resulted in a high rate of grade 3 or 4 haematological toxicity with 60% and 45% of patients experiencing severe neutropenia or thrombocytopenia respectively precluding its future development.

Therefore, combination of nutlin with targeted nongenotoxic drug may represent a more relevant approach. Several studies have reported dysregulation of the PI3K/AKT/mTOR pathway in WDLPS/DDLPS [13-14]. By using a zebrafish model, Gutierrez et al showed that AKT activation and TP53 dysregulation collaborate in WDLPS/DDLPS tumorigenesis [13]. Interestingly,

they observed as in our study that inhibitors of the PI3K-AKT-mTOR pathway such as BEZ235 were able to impair viability in human WDLPS and DDLPS cells. Smith et al demonstrated by using xenograft model of DDLPS that activation of the PI3K-AKT-mTOR pathway in these tumors was associated with a frequent loss of PTEN expression [14]. As in our study, CGH analysis of the patient tumors from which the xenografts were derived showed no genetic alterations at the PTEN locus, suggesting the involvement of epigenetic mechanisms. The cross talk between the PI3K/AKT/mTOR pathway, TP53 and MDM2 play an important role in the regulation of pro-apoptotic and anti-apoptotic signals. For instance, AKT mediates negative control of TP53 levels through enhancing MDM2 (murine double minute 2)-mediated targeting of TP53 for degradation [27]. Moreover, PTEN is able to regulate the function of TP53 by both phosphatase-dependent and -independent mechanisms [28]. Our data represent the first *in vivo* evidence that inhibition of PI3K/AKT/mTOR signalling can augment TP53-mediated apoptosis induced by MDM2 antagonist in human tumors.



**Figure 5:** A. Effect of combination of RG-7388 and BEZ-235 on tumor growth, B. the doubling time was calculated from the tumor progression curve ; C. immunohistochemistry on tumor tissues with p-S6RP and D. KI67 antibodies

Interestingly, this results are in agreement with those of Saiki et al showing that inhibition of the PI3K pathway, including PI3K itself, AKT, or mTOR, yielded profound *in vitro* synergy in combination with MDM2 inhibition in several epithelial tumors [29]. The molecular mechanisms underlying the observed synergy between TP53-MDM2 interaction and PI3K/AKT/mTOR inhibitions remains to be elucidated. Recent studies have demonstrated that one important tumor suppressive function of TP53 is related to its ability to inhibit mTOR activity [30]. In our study, western blot analysis suggested that mTOR pathway remains active after treatment with RG7388 in WDLPS/DDLPS despite induction of TP53. We observed also that treatment with BEZ235 resulted in a moderate upregulation of TP53 expression. These findings are in agreement with those from Herzog et al indicating an upregulation of TP53 in HNSCC cell lines treated with the dual inhibitor PI3K/mTOR PF-04691502 [31]. Therefore, upregulation of the PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer may be linked to repression of TP53 expression that can be reversed at least in part by inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR signaling.

In conclusion, our data represent a strong rationale to evaluate the therapeutic potential of dual PI3K/mTOR inhibitors as potentiators of TP53-MDM2 interaction antagonists in WDLPS/DDLPS. Given the devastating nature of this disease, the confirmation of our data in the clinical setting would represent a strong achievement for the sarcoma community.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and samples

We analyzed 37 cases of WDLPS (n=10) and DDLPS (n=27) with available paraffin-embedded material. All the cases were reviewed by a pathologist expert in the field of soft-tissue tumors. Immunohistochemistry for PTEN (CST 9559; 1:100, Cell signaling), and phosphorylated ribosomal protein S6 kinase (p-S6K) (CST 5364; 1:100, Cell signaling), was performed according to each manufacturer's recommendations. PTEN expression was assessed semi-quantitatively from score 0 (absence of expression) to 1 (decreased expression in tumoral cells compared with normal endothelial cells) and 2 (same intensity of staining in tumoral and normal cells). A 20% cutoff value for the detection of positive nuclear reactivity was selected for p-S6K.

### Cell lines

All the cell lines used in this study (Supplementary Table 1) have been derived from human surgical STS specimens in the laboratory of Pr Jean-Michel Coindre and

Dr Frédéric Chibon (Institut Bergonié, Bordeaux, France) after obtaining patient consent. All cell lines were cultured in RPMI 1640 medium, GlutaMAX™ Supplement (Life Technologies) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), Penicillin/Streptomycin 1%, and Normocin 0.2% (InvivoGen) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were routinely passaged every 2 or 3 days.

### Study reagents

RG7388 (MDM2-TP53 interaction inhibitor) was supplied by Roche and BEZ235 (dual PI3K/mTOR inhibitor) was purchased from Selleck Chemicals (Houston, TX, USA). Cultured cells were treated for 72 hours with medium change and fresh drug as indicated in figure legends.

### Cell viability assay

Cells were seeded in triplicate at 3000 cells/well into 96-well plates, cultured with fresh growth medium for at least 24 hours and treated with a range of increasing concentrations of drugs for 72 h. After incubation period, 2-Deoxyglucose (2-DG), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma- Aldrich Chimie, Saint-Quentin-Fallavier, France ) was immediately added to the wells at a final concentration of 0.5 mg/mL and the cells were incubated for 3 h. Then, supernatant was discarded, 100 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chimie, Saint-Quentin-Fallavier, France) was added and the absorbance was monitored using a Flexstation 3 Plate reader (Sunnyvale, CA, USA) at 570 nm with 630 nm as reference. IC<sub>50</sub> was calculated with GraphPad Prism software version 5.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA). Each experiment was repeated at least 3 times.

### Cell apoptosis assay

Cells (2x10<sup>5</sup>/well) were seeded in 6-well plates and treated for 72 hours with several specific drug concentrations. After treatment, cells were washed once with PBS and labeled with annexin-V-FITC and propidium iodide (PI) according to the manufacturer's protocol (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Then, cells were analyzed with a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The percentage of cells in early apoptosis (annexin-V positive, PI negative) and cells in late apoptosis or necrosis (annexin-V and PI positive) was calculated using FlowJo version 7.6.3 for Windows (Tree Star Inc, Ashland, OR, USA). Data are represented as mean ± SEM values, based on 3 independent experiments.



## Western blotting

Treated and control whole cells were harvested using 60  $\mu$ L Radio-ImmunoPrecipitation Assay (RIPA) lysis buffer. The lysate was centrifuged (13 000 rpm, 15 min, 4°C) and the supernatant stored at -80°C for later use. Total proteins (30  $\mu$ g) were electrophoresed on 8, 12 or 15% dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel and transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Blots were probed overnight at 4°C in 5% BSA in PBST (Phosphate 100 mM, KCl 27 mM, NaCl 1.37 M pH 7.4 after 1X dilution; 0.2% Tween-20) with primary antibody to p-AKT<sup>ser473</sup> (1: 1000, CST 4060), AKT (1: 1000, CST 4685), p-S6RP<sup>ser240/244</sup> (1: 1000, CST 2215), S6RP (1: 1000, CST 2217), 4E-BP1 (1: 1000, CST 9452), p-4E-BP1 (1: 1000, CST 9459), anti-P53 (1: 200, Santa Cruz sc-126); anti-Mdm2 (1: 500, Calbiochem IF2); anti-P21 (1: 33, Calbiochem) and glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (GAPDH, SC-51907),

Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz) were diluted 1:5000. Bound antibodies were visualized by Fusion Fx7 (Fisher Bioblock Scientific, Waltham, MA, USA) using Imobilon™ Western (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), an enhanced chemiluminescence detection kit. The resulting bands were analyzed and quantified by ImageJ® 1.49g software (National Institute of Health, Bethesda, WA, USA). GAPDH served as a loading control. Each membrane was reused 2 times after desaturation in glycin buffer (6.6mol/L, pH 2) at 56°C for 30 min.

## Drug synergy assays

Cells were treated with single drugs and combination of two drugs for 72 h. To confirm synergistic effects between two drugs, a diagonal constant ratio combination design was realized according to Chou and Talalay proposition [32]. Cells were incubated with a 2-fold serial dilution with several concentration above and below of the IC<sub>50</sub> of the two drugs at a constant ratio. After incubation period, MTT was immediately added to the wells and the absorbance was monitored using the Flexstation 3 Plate reader. The analysis of synergy assay was done by the isobologram and combination index (CI) methods, derived from the median-effect principle of Chou and Talalay. The combination effects of the two agents can be summarized as follows: combination index (CI) < 1 (under the curve), CI = 1 (near the curve), and CI > 1 (above the curve) indicates synergistic, additive and antagonistic effects respectively. Synergy experiments were repeated at least three times.

## Animal studies

All animal experiments were performed with the approval of the institutional animal use and care committee. IB115 cells (5 x 10<sup>6</sup> cells/200 $\mu$ L) were inoculated subcutaneously into the right flank of Ragy2C-/- mice (n=10). Once palpable, tumor volumes were calculated using the following formula: length x width<sup>2</sup> / 2. After tumors reached approximately 200 mm<sup>3</sup> in average size, animals were treated by oral gavage for the two drugs every day; briefly BEZ was dissolved in 1 volume of NMP (1-methyl-2-pyrrolidone) in a 100°C water bath, then 9 volume of PEG300 (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) were added. The Nutlin was dissolved in a solution supplied by Roche. Mice were randomized to receive 40mg/kg BEZ, 50 mg/kg Nutlin or both drugs in combination. Three weeks after drug administration, the mice were sacrificed and tumors were excised and harvested in 10% paraformaldehyde. Tumor progression was analyzed with GraphPad Prism software. Paraffin sections were incubated with anti-p-S6RP<sup>ser240/244</sup> (CST 5364; 1:100) and anti-Ki-67 (Ventana 790-4286; 1:100) antibodies. Percentage of labelled cells was estimated by a pathologist expert in soft-tissue tumors. The intensity of p-S6RP<sup>ser240/244</sup> staining was scored as follows: 0, negative; 1+, weak staining; 2+, intermediate staining; 3+, strong staining. Scoring was performed without knowledge of tumor response. Tissue pictures was carried out with an Olympus CKX41 (x100) using image capture cellSens Entry software version 1.14 (Olympus, Rungis, France) for Windows.

## CONFLICTS OF INTEREST

None declared.

## Editorial note

This paper has been accepted based in part on peer-review conducted by another journal and the authors' response and revisions as well as expedited peer-review in Oncotarget.

## REFERENCES

1. Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone. In Kleihues P (ed) World Health Organisation Classification of Tumours, Edition Lyon, France: IARC Press 2002.
2. Mussi C, Collini P, Miceli R et al. The prognostic impact of dedifferentiation in retroperitoneal liposarcoma: a series of surgically treated patients at a single institution. Cancer 2008; 113: 1657-1665.
3. Coindre JM, Pedeutour F, Aurias A. Well-differentiated and

- dedifferentiated liposarcomas. *Virchows Arch* 2010; 456: 167-179.
4. Lucas DR, Nascimento AG, Sanjay BK, Rock MG. Well-differentiated liposarcoma. The Mayo Clinic experience with 58 cases. *Am J Clin Pathol* 1994; 102: 677-683.
  5. Henricks WH, Chu YC, Goldblum JR, Weiss SW. Dedifferentiated liposarcoma: a clinicopathological analysis of 155 cases with a proposal for an expanded definition of dedifferentiation. *Am J Surg Pathol* 1997; 21:271-281.
  6. Dalal KM, Kattan MW, Antonescu CR et al. Subtype specific prognostic nomogram for patients with primary liposarcoma of the retroperitoneum, extremity, or trunk. *Ann Surg* 2006; 244: 381-391.
  7. Singer S, Antonescu CR, Riedel E, Brennan MF. Histologic subtype and margin of resection predict pattern of recurrence and survival for retroperitoneal liposarcoma. *Ann Surg* 2003; 238: 358-370; discussion 370-351.
  8. Italiano A, Toulmonde M, Cioffi A, Penel N, Isambert N, Bompas E, Duffaud F, Patrikidou A, Lortal B, Le Cesne A, Blay JY, Maki RG, Schwartz GK, Antonescu CR, Singer S, Coindre JM, Bui B. Advanced well-differentiated/dedifferentiated liposarcomas: role of chemotherapy and survival. *Ann Oncol*. 2012;23:1601-7.
  9. Italiano A, Bianchini L, Keslair F, et al. HMG2 is the partner of MDM2 in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas whereas CDK4 belongs to a distinct inconsistent amplicon. *Int J Cancer* 2008;122:2233-41.
  10. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, et al. In vivo activation of the TP53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004;303:844.
  11. Ray-Coquard I1, Blay JY, Italiano A, Le Cesne A, Penel N, Zhi J, Heil F, Rueger R, Graves B, Ding M, Geho D, Middleton SA, Vassilev LT, Nichols GL, Bui BN. Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the TP53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study. *Lancet Oncol*. 2012 Nov;13(11):1133-40.
  12. Siu LL, Italiano A, Miller WH, Blay JY, Gietema JA, Bang YJ, Mileskin LR, Hirte HW, Reckner M, Higgins B, Jukofsky L, Blotner S, Zhi J, Middleton S, Nichols GL, Chen LC. Phase I dose escalation, food effect, and biomarker study of RG7388, a more potent second-generation MDM2 antagonist, in patients (pts) with solid tumors. *J Clin Oncol* 32:5s, 2014 (suppl; abstr 2535)
  13. Gutierrez A, Snyder EL, Marino-Enriquez A, Zhang YX, Sioletic S, Kozakewich E, Grebliunaite R, Ou WB, Sicinska E, Raut CP, Demetri GD, Perez-Atayde AR, Wagner AJ, Fletcher JA, Fletcher CD, Look AT. Aberrant AKT activation drives well-differentiated liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:16386-9.
  14. Smith KB, Tran LM, Tam BM, Shurell EM, Li Y, Braas D, Tap WD, Christofk HR, Dry SM, Eilber FC, Wu H. Novel dedifferentiated liposarcoma xenograft models reveal PTEN down-regulation as a malignant signature and response to PI3K pathway inhibition. *Am J Pathol*. 2013;182:1400-11.
  15. Mayo LD, et al. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 11598-11603.
  16. Stambolic V, et al. Regulation of PTEN Transcription by TP53. *Mol Cell* 2001; 8: 317-325.
  17. Trotman LC, et al. PTEN and TP53: Who will get the upper hand? *Cancer Cell* 2003; 3: 97-99.
  18. Tang Y, et al. TP53 Down-Regulates Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10 Protein Stability Partially through Caspase-Mediated Degradation in Cells with Proteasome Dysfunction. *Cancer Res* 2006; 66: 6139-6148.
  19. Tang Y, et al. PTEN Autoregulates Its Expression by Stabilization of TP53 in a Phosphatase-Independent Manner. *Cancer Res* 2006; 66: 736-742.
  20. Müller CR, et al. Potential for treatment of liposarcomas with the MDM2 antagonist Nutlin3A. *Int J Cancer*. 2007; 121: 199205.
  21. Pishas KI, et al. Nutlin3a is a potential therapeutic for ewing sarcoma. *Clin Cancer Res*. 2011; 17: 494504.
  22. Wang B, et al. MDM2 inhibitor Nutlin3a suppresses proliferation and promotes apoptosis in osteosarcoma cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2012; 44: 685-91.
  23. Coll-Mulet L, Iglesias-Serret D, Santidrian AF, et al. MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2006;107:4109-14.
  24. Kojima K, Konopleva M, McQueen T, et al. Mdm2 inhibitor Nutlin-3a induces p53-mediated apoptosis by transcription-dependent and transcription-independent mechanisms and may overcome Atm-mediated resistance to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;108:993-1000.
  25. Ohnstad HO1, Paulsen EB, Noordhuis P, Berg M, Lothe RA, Vassilev LT, Myklebost O. MDM2 antagonist Nutlin-3a potentiates antitumour activity of cytotoxic drugs in sarcoma cell lines. *BMC Cancer*. 2011 11:211:1-11.
  26. Chawla SP, Blay JY, Italiano A, Gutierrez M, Le Cesne A, Gomez-Roca CA, Gouw LG, von Mehren M, Wagner A, Maki RG, Higgins B, Middleton S, Nichols GW, Geho D, Blotner S, Zhi J, Chen LC. Phase Ib study of RG7112 with doxorubicin (D) in advanced soft tissue sarcoma (ASTS). *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr 10514)
  27. Abraham AG, O'Neill E. PI3K/Akt-mediated regulation of TP53 in cancer. *Biochem Soc Trans*. 2014;42:798-803.
  28. Mayo LD, Donner DB. The PTEN, Mdm2, TP53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem Sci*. 2002;27:462-7.
  29. Saiki AY, Caenepeel S, Yu D, Lofgren JA, Osgood T, Robertson R, Canon J, Su C, Jones A, Zhao X, Deshpande C, Payton M, Ledell J, Hughes PE, Oliner JD. MDM2

- antagonists synergize broadly and robustly with compounds targeting fundamental oncogenic signaling pathways. *Oncotarget*. 2014;5:2030-43.
30. Akeno N, Miller AL, Ma X, Wikenheiser-Brokamp KA. p53 suppresses carcinoma progression by inhibiting mTOR pathway activation. *Oncogene*. 2015 29;34:589-99.
  31. Herzog A, Bian Y, Vander Broek R, Hall B, Coupar J, Cheng H, Sowers AL, Cook JD, Mitchell JB, Chen Z, Kulkarni AB, Van Waes C. PI3K/mTOR inhibitor PF-04691502 antitumor activity is enhanced with induction of wild-type TP53 in human xenograft and murine knockout models of head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19:3808-19.
  32. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*. 1984;22:27-55.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abbasi, F., Mahmudlu, R., Nikniaz, Y., and Rezaie, M. (2015). Primary Cutaneous Leiomyosarcoma in a Young Patient Previously Misdiagnosed as Pleomorphic Fibroma. *Iran. J. Pathol.* *10*, 69–73.
- Agaram, N.P., Zhang, L., LeLoarer, F., Silk, T., Sung, Y.-S., Scott, S.N., Kuk, D., Qin, L.-X., Berger, M.F., Antonescu, C.R., et al. (2016). Targeted exome sequencing profiles genetic alterations in leiomyosarcoma. *Genes. Chromosomes Cancer* *55*, 124–130.
- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* *15*, 6541–6551.
- Al-Khouri, A.M., Ma, Y., Togo, S.H., Williams, S., and Mustelin, T. (2005). Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta. *J. Biol. Chem.* *280*, 35195–35202.
- American Joint Committee on Cancer (2017). *AJCC Cancer Staging Manual*. Springer.
- Andjelković, M., Jakubowicz, T., Cron, P., Ming, X.F., Han, J.W., and Hemmings, B.A. (1996). Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 5699–5704.
- Andjelković, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M., and Hemmings, B.A. (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* *272*, 31515–31524.
- Antman, K., Crowley, J., Balcerzak, S.P., Rivkin, S.E., Weiss, G.R., Elias, A., Natale, R.B., Cooper, R.M., Barlogie, B., and Trump, D.L. (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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *11*, 1276–1285.
- Aurias, A., Rimbaut, C., Buffe, D., Dubousset, J., and Mazabraud, A. (1983). Chromosomal translocations in Ewing's sarcoma. *N. Engl. J. Med.* *309*, 496–498.
- Awad, O., Yustein, J.T., Shah, P., Gul, N., Katuri, V., O'Neill, A., Kong, Y., Brown, M.L., Toretsky, J.A., and Loeb, D.M. (2010). High ALDH activity identifies chemotherapy-resistant Ewing's sarcoma stem cells that retain sensitivity to EWS-FLI1 inhibition. *PLoS One* *5*, e13943.
- Babichev, Y., Kabaroff, L., Datti, A., Uehling, D., Isaac, M., Al-Awar, R., Prakesch, M., Sun, R.X., Boutros, P.C., Venier, R., et al. (2016). PI3K/AKT/mTOR inhibition in combination with doxorubicin is an effective therapy for leiomyosarcoma. *J. Transl. Med.* *14*, 67.
- Backer, J.M. (2008). The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem. J.* *410*, 1–17.
- Balic, M., Lin, H., Young, L., Hawes, D., Giuliano, A., McNamara, G., Datar, R.H., and Cote, R.J. (2006). Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 5615–5621.

- Ballinger, M.L., Goode, D.L., Ray-Coquard, I., James, P.A., Mitchell, G., Niedermayr, E., Puri, A., Schiffman, J.D., Dite, G.S., Cipponi, A., et al. (2016). Monogenic and polygenic determinants of sarcoma risk: an international genetic study. *Lancet Oncol.* *17*, 1261–1271.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* *444*, 756–760.
- Barretina, J., Taylor, B.S., Banerji, S., Ramos, A.H., Lags-Quintana, M., Decarolis, P.L., Shah, K., Socci, N.D., Weir, B.A., Ho, A., et al. (2010). Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nat. Genet.* *42*, 715–721.
- Bauer, T.M., Patel, M.R., and Infante, J.R. (2015). Targeting PI3 kinase in cancer. *Pharmacol. Ther.* *146*, 53–60.
- Becker, C.M., Oberoi, R.K., McFarren, S.J., Muldoon, D.M., Pafundi, D.H., Pokorny, J.L., Brinkmann, D.H., Ohlfest, J.R., Sarkaria, J.N., Largaespada, D.A., et al. (2015). Decreased affinity for efflux transporters increases brain penetrance and molecular targeting of a PI3K/mTOR inhibitor in a mouse model of glioblastoma. *Neuro-Oncol.* *17*, 1210–1219.
- Ben-Sahra, I., and Manning, B.D. (2017). mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* *45*, 72–82.
- Bhaskar, P.T., and Hay, N. (2007). The two TORCs and Akt. *Dev. Cell* *12*, 487–502.
- Biegel, J.A., Zhou, J.Y., Rorke, L.B., Stenstrom, C., Wainwright, L.M., and Fogelgren, B. (1999). Germ-line and acquired mutations of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumors. *Cancer Res.* *59*, 74–79.
- Boam, T., Hueschelrath, A., Tho, L., Costa, T.M. da, McMurrey, A., and Gollogly, J. (2016). Managing Soft Tissue Sarcomas in a Developing Health System. *World J. Surg.* *40*, 1542–1549.
- Bozulic, L., Surucu, B., Hynx, D., and Hemmings, B.A. (2008). PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. *Mol. Cell* *30*, 203–213.
- Bradshaw, A., Wickremesekera, A., Brasch, H.D., Chibnall, A.M., Davis, P.F., Tan, S.T., and Itinteang, T. (2016). Cancer Stem Cells in Glioblastoma Multiforme. *Front. Surg.* *3*, 48.
- Brock, C., Schaefer, M., Reusch, H.P., Czupalla, C., Michalke, M., Spicher, K., Schultz, G., and Nürnberg, B. (2003). Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma. *J. Cell Biol.* *160*, 89–99.
- Brown, J.S., and Banerji, U. (2017). Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments. *Pharmacol. Ther.* *172*, 101–115.
- Cardillo, T.M., Trisal, P., Arrojo, R., Goldenberg, D.M., and Chang, C.-H. (2013). Targeting both IGF-1R and mTOR synergistically inhibits growth of renal cell carcinoma in vitro. *BMC Cancer* *13*, 170.

- Carracedo, A., Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., Egia, A., Sasaki, A.T., Thomas, G., Kozma, S.C., et al. (2008). Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J. Clin. Invest.* *118*, 3065–3074.
- Carriere, A., Romeo, Y., Acosta-Jaquez, H.A., Moreau, J., Bonneil, E., Thibault, P., Fingar, D.C., and Roux, P.P. (2011). ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). *J. Biol. Chem.* *286*, 567–577.
- Chan, C.-H., Jo, U., Kohrman, A., Rezaeian, A.H., Chou, P.-C., Logothetis, C., and Lin, H.-K. (2014). Posttranslational regulation of Akt in human cancer. *Cell Biosci.* *4*, 59.
- Chan, T.O., Rittenhouse, S.E., and Tsichlis, P.N. (1999). AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 965–1014.
- Chang, L., Graham, P.H., Hao, J., Ni, J., Bucci, J., Cozzi, P.J., Kearsley, J.H., and Li, Y. (2013). Acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance. *Cell Death Dis.* *4*, e875.
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M., and Moore, P.S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* *266*, 1865–1869.
- Chen, M., Pratt, C.P., Zeeman, M.E., Schultz, N., Taylor, B.S., O'Neill, A., Castillo-Martin, M., Nowak, D.G., Naguib, A., Grace, D.M., et al. (2011). Identification of PHLPP1 as a tumor suppressor reveals the role of feedback activation in PTEN-mutant prostate cancer progression. *Cancer Cell* *20*, 173–186.
- Cheng, H., Zou, Y., Ross, J.S., Wang, K., Liu, X., Halmos, B., Ali, S.M., Liu, H., Verma, A., Montagna, C., et al. (2015). RICTOR Amplification Defines a Novel Subset of Patients with Lung Cancer Who May Benefit from Treatment with mTORC1/2 Inhibitors. *Cancer Discov.* *5*, 1262–1270.
- Cheraghchi-Bashi, A., Parker, C.A., Curry, E., Salazar, J.-F., Gungor, H., Saleem, A., Cunnea, P., Rama, N., Salinas, C., Mills, G.B., et al. (2015). A putative biomarker signature for clinically effective AKT inhibition: correlation of in vitro, in vivo and clinical data identifies the importance of modulation of the mTORC1 pathway. *Oncotarget* *6*, 41736–41749.
- Clément, S., Krause, U., Desmedt, F., Tanti, J.F., Behrends, J., Pesesse, X., Sasaki, T., Penninger, J., Doherty, M., Malaisse, W., et al. (2001). The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* *409*, 92–97.
- Coggon, D., Ntani, G., Harris, E.C., Jayakody, N., and Palmer, K.T. (2015). Soft tissue sarcoma, non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia in workers exposed to phenoxy herbicides: extended follow-up of a UK cohort. *Occup. Environ. Med.* *72*, 435–441.

- Coindre, J.M., Trojani, M., Contesso, G., David, M., Rouesse, J., Bui, N.B., Bodaert, A., De Mascarel, I., De Mascarel, A., and Goussot, J.F. (1986). Reproducibility of a histopathologic grading system for adult soft tissue sarcoma. *Cancer* 58, 306–309.
- Coindre, J.M., Terrier, P., Bui, N.B., Bonichon, F., Collin, F., Le Doussal, V., Mandard, A.M., Vilain, M.O., Jacquemier, J., Duplay, H., et al. (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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 14, 869–877.
- Courtney, K.D., Corcoran, R.B., and Engelman, J.A. (2010). The PI3K Pathway As Drug Target in Human Cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 1075–1083.
- Cuppens, T., Annibaldi, D., Coosemans, A., Trovik, J., Ter Haar, N., Colas, E., Garcia-Jimenez, A., Van de Vijver, K., Kruitwagen, R.P.M., Brinkhuis, M., et al. (2017). Potential Targets' Analysis Reveals Dual PI3K/mTOR Pathway Inhibition as a Promising Therapeutic Strategy for Uterine Leiomyosarcomas-an ENITEC Group Initiative. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 23, 1274–1285.
- Demetri, G.D., von Mehren, M., Jones, R.L., Hensley, M.L., Schuetze, S.M., Staddon, A., Milhem, M., Elias, A., Ganjoo, K., Tawbi, H., et al. (2016). Efficacy and Safety of Trabectedin or Dacarbazine for Metastatic Liposarcoma or Leiomyosarcoma After Failure of Conventional Chemotherapy: Results of a Phase III Randomized Multicenter Clinical Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 34, 786–793.
- Dennis, N., Francis, M., and Lawrence, G. (2012). Soft tissue sarcoma, incidence and survival; report on tumours diagnosed between 1985 and 2009. 2012 R12/06.
- Dey, B.R., Frick, K., Lopaczynski, W., Nissley, S.P., and Furlanetto, R.W. (1996). Evidence for the direct interaction of the insulin-like growth factor I receptor with IRS-1, Shc, and Grb10. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 10, 631–641.
- Dick, J.E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793–4807.
- Dienstmann, R., Rodon, J., Serra, V., and Tabernero, J. (2014). Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* 13, 1021–1031.
- Ding, Q., He, X., Hsu, J.-M., Xia, W., Chen, C.-T., Li, L.-Y., Lee, D.-F., Liu, J.-C., Zhong, Q., Wang, X., et al. (2007). Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4006–4017.
- Dolly, S.O., Wagner, A.J., Bendell, J.C., Kindler, H.L., Krug, L.M., Seiwert, T.Y., Zauderer, M.G., Lolkema, M.P., Apt, D., Yeh, R.-F., et al. (2016). Phase I Study of Apatolisib (GDC-0980), Dual Phosphatidylinositol-3-Kinase and Mammalian Target of Rapamycin Kinase Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 2874–2884.
- Donnenberg, V.S., and Donnenberg, A.D. (2005). Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J. Clin. Pharmacol.* 45, 872–877.



Ducimetière, F., Lurkin, A., Ranchère-Vince, D., Decouvelaere, A.-V., Péoc'h, M., Istier, L., Chalabreysse, P., Muller, C., Alberti, L., Bringuier, P.-P., et al. (2011). Incidence of sarcoma histotypes and molecular subtypes in a prospective epidemiological study with central pathology review and molecular testing. *PLoS One* 6, e20294.

Dumont, F.J., Staruch, M.J., Grammer, T., Blenis, J., Kastner, C.A., and Rupperecht, K.M. (1995). Dominant mutations confer resistance to the immunosuppressant, rapamycin, in variants of a T cell lymphoma. *Cell. Immunol.* 163, 70–79.

Düvel, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., et al. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol. Cell* 39, 171–183.

Ebner, M., Lučić, I., Leonard, T.A., and Yudushkin, I. (2017). PI(3,4,5)P3 Engagement Restricts Akt Activity to Cellular Membranes. *Mol. Cell* 65, 416–431.e6.

Elkabets, M., Vora, S., Juric, D., Morse, N., Mino-Kenudson, M., Muranen, T., Tao, J., Campos, A.B., Rodon, J., Ibrahim, Y.H., et al. (2013). mTORC1 inhibition is required for sensitivity to PI3K p110 $\alpha$  inhibitors in PIK3CA-mutant breast cancer. *Sci. Transl. Med.* 5, 196ra99.

ElMokh, O., Ruffieux-Daidié, D., Roelli, M.A., Stooss, A., Phillips, W.A., Gertsch, J., Dettmer, M.S., and Charles, R.-P. (2017). Combined MEK and Pi3'-kinase inhibition reveals synergy in targeting thyroid cancer in vitro and in vivo. *Oncotarget* 8, 24604–24620.

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.

Escrivà, M., Peiró, S., Herranz, N., Villagrasa, P., Dave, N., Montserrat-Sentís, B., Murray, S.A., Francí, C., Gridley, T., Virtanen, I., et al. (2008). Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1528–1540.

Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A.C., Mao, Y., Miao, R.Q., et al. (2008). The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J.* 27, 1932–1943.

Falasca, M., and Maffucci, T. (2012). Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases. *Biochem. J.* 443, 587–601.

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.

Fedele, C.G., Ooms, L.M., Ho, M., Vieusseux, J., O'Toole, S.A., Millar, E.K., Lopez-Knowles, E., Sriratana, A., Gurung, R., Baglietto, L., et al. (2010). Inositol polyphosphate 4-phosphatase II regulates PI3K/Akt signaling and is lost in human basal-like breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22231–22236.

- Ferrari, A., Dirksen, U., and Bielack, S. (2016). Sarcomas of Soft Tissue and Bone. *Prog. Tumor Res.* 43, 128–141.
- Fields, J.P., and Helwig, E.B. (1981). Leiomyosarcoma of the skin and subcutaneous tissue. *Cancer* 47, 156–169.
- Fletcher, C.D.M. (2014). The evolving classification of soft tissue tumours – an update based on the new 2013 WHO classification. *Histopathology* 64, 2–11.
- Fletcher, C., Bridge, J., Hogendoorn, P., and Mertens, F. eds (2013). World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of soft Tissue and bone. (Lyon: IARC Press).
- Foley, T.M., Payne, S.N., Pasch, C.A., Yueh, A.E., Van De Hey, D.R., Korkos, D.P., Clipson, L., Maher, M.E., Matkowskyj, K.A., Newton, M.A., et al. (2017). Dual PI3K/mTOR Inhibition in Colorectal Cancers with APC and PIK3CA Mutations. *Mol. Cancer Res. MCR* 15, 317–327.
- Francis, J.H., Kleinerman, R.A., Seddon, J.M., and Abramson, D.H. (2012). Increased risk of secondary uterine leiomyosarcoma in hereditary retinoblastoma. *Gynecol. Oncol.* 124, 254–259.
- Frech, M., Andjelkovic, M., Ingley, E., Reddy, K.K., Falck, J.R., and Hemmings, B.A. (1997). High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 8474–8481.
- Friedrich, R.E., Hartmann, M., and Mautner, V.F. (2007). Malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) in NF1-affected children. *Anticancer Res.* 27, 1957–1960.
- Fritsche-Guenther, R., Witzel, F., Sieber, A., Herr, R., Schmidt, N., Braun, S., Brummer, T., Sers, C., and Blüthgen, N. (2011). Strong negative feedback from Erk to Raf confers robustness to MAPK signalling. *Mol. Syst. Biol.* 7, 489.
- Galper, S., Gelman, R., Recht, A., Silver, B., Kohli, A., Wong, J.S., Van Buren, T., Baldini, E.H., and Harris, J.R. (2002). Second nonbreast malignancies after conservative surgery and radiation therapy for early-stage breast cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 52, 406–414.
- Gan, X., Wang, J., Wang, C., Sommer, E., Kozasa, T., Srinivasula, S., Alessi, D., Offermanns, S., Simon, M.I., and Wu, D. (2012). PRR5L degradation promotes mTORC2-mediated PKC- $\delta$  phosphorylation and cell migration downstream of G $\alpha$ 12. *Nat. Cell Biol.* 14, 686–696.
- Gao, T., Furnari, F., and Newton, A.C. (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol. Cell* 18, 13–24.
- García-Del-Muro, X., López-Pousa, A., Maurel, J., Martín, J., Martínez-Trufero, J., Casado, A., Gómez-España, A., Fra, J., Cruz, J., Poveda, A., et al. (2011). Randomized phase II study comparing gemcitabine plus dacarbazine versus dacarbazine alone in patients with previously treated soft tissue sarcoma: a Spanish Group for Research on Sarcomas study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 2528–2533.

- Garcia-Donas, J., Rodriguez-Antona, C., and Jonasch, E. (2013). Molecular markers to predict response to therapy. *Semin. Oncol.* *40*, 444–458.
- García-Martínez, J.M., and Alessi, D.R. (2008). mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem. J.* *416*, 375–385.
- George, S., Wang, Q., Heinrich, M.C., Corless, C.L., Zhu, M., Butrynski, J.E., Morgan, J.A., Wagner, A.J., Choy, E., Tap, W.D., et al. (2012). Efficacy and safety of regorafenib in patients with metastatic and/or unresectable GI stromal tumor after failure of imatinib and sunitinib: a multicenter phase II trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *30*, 2401–2407.
- Gil, J., Stembalska, A., Pesz, K.A., and Sasiadek, M.M. (2008). Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J. Appl. Genet.* *49*, 193–199.
- Gingras, A.C., Raught, B., Gygi, S.P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S.K., Polakiewicz, R.D., Wyslouch-Cieszynska, A., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (2001). Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev.* *15*, 2852–2864.
- Goldblum, J.R., Folpe, A.L., Weiss, S.W., Enzinger, F.M., and Weiss, S.W. (2014). *Enzinger and Weiss's soft tissue tumors* (Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier).
- Gomez-Pinillos, A., and Ferrari, A.C. (2012). mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer therapy. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* *26*, 483–505, vii.
- Gonzalez-Angulo, A.M., Juric, D., Argilés, G., Schellens, J.H., Burris, H.A., Berlin, J., Middleton, M.R., Schuler, M.H., Geel, R.V., Helgason, T., et al. (2013). Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the  $\alpha$ -specific PI3K inhibitor BYL719: Results from the first-in-human study. *J. Clin. Oncol.* *31*, 2531–2531.
- Gopal, A.K., Kahl, B.S., de Vos, S., Wagner-Johnston, N.D., Schuster, S.J., Jurczak, W.J., Flinn, I.W., Flowers, C.R., Martin, P., Viardot, A., et al. (2014). PI3K $\delta$  inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma. *N. Engl. J. Med.* *370*, 1008–1018.
- van der Graaf, W.T.A., Blay, J.-Y., Chawla, S.P., Kim, D.-W., Bui-Nguyen, B., Casali, P.G., Schöffski, P., Aglietta, M., Staddon, A.P., Beppu, Y., et al. (2012). Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* *379*, 1879–1886.
- Grimer, R., Judson, I., Peake, D., and Seddon, B. (2010). *Guidelines for the Management of Soft Tissue Sarcomas*.
- Gronchi, A., Miceli, R., Shurell, E., Eilber, F.C., Eilber, F.R., Anaya, D.A., Kattan, M.W., Honoré, C., Lev, D.C., Colombo, C., et al. (2013). Outcome prediction in primary resected retroperitoneal soft tissue sarcoma: histology-specific overall survival and disease-free survival nomograms built on major sarcoma center data sets. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *31*, 1649–1655.
- Gronchi, A., Strauss, D.C., Miceli, R., Bonvalot, S., Swallow, C.J., Hohenberger, P., Van Coevorden, F., Rutkowski, P., Callegaro, D., Hayes, A.J., et al. (2016). Variability in Patterns of Recurrence After Resection of Primary Retroperitoneal Sarcoma (RPS): A Report on 1007

Patients From the Multi-institutional Collaborative RPS Working Group. *Ann. Surg.* *263*, 1002–1009.

Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., and Sabatini, D.M. (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC $\alpha$ , but not S6K1. *Dev. Cell* *11*, 859–871.

Guillou, L., and Aurias, A. (2010). Soft tissue sarcomas with complex genomic profiles. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* *456*, 201–217.

Gulen, M.F., Bulek, K., Xiao, H., Yu, M., Gao, J., Sun, L., Beurel, E., Kaidanovich-Beilin, O., Fox, P.L., DiCorleto, P.E., et al. (2012). Inactivation of the enzyme GSK3 $\alpha$  by the kinase IKKi promotes AKT-mTOR signaling pathway that mediates interleukin-1-induced Th17 cell maintenance. *Immunity* *37*, 800–812.

Guo, H., Gao, M., Lu, Y., Liang, J., Lorenzi, P.L., Bai, S., Hawke, D.H., Li, J., Dogruluk, T., Scott, K.L., et al. (2014). Coordinate phosphorylation of multiple residues on single AKT1 and AKT2 molecules. *Oncogene* *33*, 3463–3472.

Gupta, S., Ramjaun, A.R., Haiko, P., Wang, Y., Warne, P.H., Nicke, B., Nye, E., Stamp, G., Alitalo, K., and Downward, J. (2007). Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110 $\alpha$  is required for ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell* *129*, 957–968.

Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* *30*, 214–226.

Hager, S., Makowiec, F., Henne, K., Hopt, U.T., and Wittel, U.A. (2017). Significant benefits in survival by the use of surgery combined with radiotherapy for retroperitoneal soft tissue sarcoma. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* *12*, 29.

Hanada, M., Feng, J., and Hemmings, B.A. (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta* *1697*, 3–16.

Hayashi, H., Tsuchiya, Y., Nakayama, K., Satoh, T., and Nishida, E. (2008). Down-regulation of the PI3-kinase/Akt pathway by ERK MAP kinase in growth factor signaling. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *13*, 941–947.

Hegedüs, C., Truta-Feles, K., Antalffy, G., Brózik, A., Kasza, I., Németh, K., Orbán, T.I., Özvegy-Laczka, C., Váradi, A., and Sarkadi, B. (2012). PI3-kinase and mTOR inhibitors differently modulate the function of the ABCG2 multidrug transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *420*, 869–874.

Helgason, C.D., Kalberer, C.P., Damen, J.E., Chappel, S.M., Pineault, N., Krystal, G., and Humphries, R.K. (2000). A dual role for Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase (SHIP) in immunity: aberrant development and enhanced function of B lymphocytes in ship  $-/-$  mice. *J. Exp. Med.* *191*, 781–794.

Henson, J.D., Hannay, J.A., McCarthy, S.W., Royds, J.A., Yeager, T.R., Robinson, R.A., Wharton, S.B., Jellinek, D.A., Arbuckle, S.M., Yoo, J., et al. (2005). A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative

lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *11*, 217–225.

Heppner, G.H. (1984). Tumor heterogeneity. *Cancer Res.* *44*, 2259–2265.

Hernando, E., Charytonowicz, E., Dudas, M.E., Menendez, S., Matushansky, I., Mills, J., Socci, N.D., Behrendt, N., Ma, L., Maki, R.G., et al. (2007). The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas. *Nat. Med.* *13*, 748–753.

Hers, I., Vincent, E.E., and Tavaré, J.M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cell. Signal.* *23*, 1515–1527.

Hettinger, K., Vikhanskaya, F., Poh, M.K., Lee, M.K., de Belle, I., Zhang, J.-T., Reddy, S. a. G., and Sabapathy, K. (2007). c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN. *Cell Death Differ.* *14*, 218–229.

Hirai, H., Sootome, H., Nakatsuru, Y., Miyama, K., Taguchi, S., Tsujioka, K., Ueno, Y., Hatch, H., Majumder, P.K., Pan, B.-S., et al. (2010). MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* *9*, 1956–1967.

Holst, V.A., Junkins-Hopkins, J.M., and Elenitsas, R. (2002). Cutaneous smooth muscle neoplasms: clinical features, histologic findings, and treatment options. *J. Am. Acad. Dermatol.* *46*, 477-490; quiz, 491–494.

Holz, M.K., Ballif, B.A., Gygi, S.P., and Blenis, J. (2005). mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* *123*, 569–580.

Honoré, C., Méeus, P., Stoeckle, E., and Bonvalot, S. (2015). Soft tissue sarcoma in France in 2015: Epidemiology, classification and organization of clinical care. *J. Visc. Surg.* *152*, 223–230.

Hu, J., Rao, U.N.M., Jasani, S., Khanna, V., Yaw, K., and Surti, U. (2005). Loss of DNA copy number of 10q is associated with aggressive behavior of leiomyosarcomas: a comparative genomic hybridization study. *Cancer Genet. Cytogenet.* *161*, 20–27.

Huang, J., Dibble, C.C., Matsuzaki, M., and Manning, B.D. (2008). The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 4104–4115.

Huw, L.-Y., O'Brien, C., Pandita, A., Mohan, S., Spoerke, J.M., Lu, S., Wang, Y., Hampton, G.M., Wilson, T.R., and Lackner, M.R. (2013). Acquired PIK3CA amplification causes resistance to selective phosphoinositide 3-kinase inhibitors in breast cancer. *Oncogenesis* *2*, e83.

Inaba, M., Kobayashi, H., Sakurai, Y., and Johnson, R.K. (1979). Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia. *Cancer Res.* *39*, 2200–2203.

Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.-L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* *4*, 648–657.

- Inoki, K., Li, Y., Xu, T., and Guan, K.-L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* *17*, 1829–1834.
- Italiano, A., Toulmonde, M., Stoeckle, E., Kind, M., Kantor, G., Coindre, J.-M., and Bui, B. (2010). Clinical outcome of leiomyosarcomas of vascular origin: comparison with leiomyosarcomas of other origin. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *21*, 1915–1921.
- Italiano, A., Kind, M., Stoeckle, E., Jones, N., Coindre, J.-M., and Bui, B. (2011). Temsirolimus in advanced leiomyosarcomas: patterns of response and correlation with the activation of the mammalian target of rapamycin pathway. *Anticancer. Drugs* *22*, 463–467.
- Iwenofu, O.H., Lackman, R.D., Staddon, A.P., Goodwin, D.G., Haupt, H.M., and Brooks, J.S.J. (2008). Phospho-S6 ribosomal protein: a potential new predictive sarcoma marker for targeted mTOR therapy. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* *21*, 231–237.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M.A., Hall, A., and Hall, M.N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* *6*, 1122–1128.
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J., and Su, B. (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* *127*, 125–137.
- Jain, S., Xu, R., Prieto, V.G., and Lee, P. (2010). Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *3*, 416–429.
- Jin, L., Hope, K.J., Zhai, Q., Smadja-Joffe, F., and Dick, J.E. (2006). Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat. Med.* *12*, 1167–1174.
- Juric, D., Castel, P., Griffith, M., Griffith, O.L., Won, H.H., Ellis, H., Ebbesen, S.H., Ainscough, B.J., Ramu, A., Iyer, G., et al. (2015). Convergent loss of PTEN leads to clinical resistance to a PI(3)K $\alpha$  inhibitor. *Nature* *518*, 240–244.
- Kaidanovich-Beilin, O., and Woodgett, J.R. (2011). GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. *Front. Mol. Neurosci.* *4*, 40.
- Katz, M., Amit, I., and Yarden, Y. (2007). Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 1161–1176.
- 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.
- Keniry, M., and Parsons, R. (2011). mTOR inhibition, the second generation: ATP-competitive mTOR inhibitor initiates unexpected receptor tyrosine kinase-driven feedback loop. *Cancer Discov.* *1*, 203–204.
- Kim, D.-D., and Eng, C. (2012). The promise of mTOR inhibitors in the treatment of colorectal cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* *21*, 1775–1788.

- Kim, S.J., DeStefano, M.A., Oh, W.J., Wu, C., Vega-Cotto, N.M., Finlan, M., Liu, D., Su, B., and Jacinto, E. (2012). mTOR complex 2 regulates proper turnover of insulin receptor substrate-1 via the ubiquitin ligase subunit Fbw8. *Mol. Cell* *48*, 875–887.
- Kimura, Y., Morita, T., Hayashi, K., Miki, T., and Sobue, K. (2010). Myocardin functions as an effective inducer of growth arrest and differentiation in human uterine leiomyosarcoma cells. *Cancer Res.* *70*, 501–511.
- Kiyatkin, A., Aksamitiene, E., Markevich, N.I., Borisov, N.M., Hoek, J.B., and Kholodenko, B.N. (2006). Scaffolding protein Grb2-associated binder 1 sustains epidermal growth factor-induced mitogenic and survival signaling by multiple positive feedback loops. *J. Biol. Chem.* *281*, 19925–19938.
- Kleinerman, R.A., Yu, C.-L., Little, M.P., Li, Y., Abramson, D., Seddon, J., and Tucker, M.A. (2012). Variation of second cancer risk by family history of retinoblastoma among long-term survivors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *30*, 950–957.
- Klümpen, H.-J., Beijnen, J.H., Gurney, H., and Schellens, J.H.M. (2010). Inhibitors of mTOR. *The Oncologist* *15*, 1262–1269.
- Koren, S., and Bentires-Alj, M. (2017). Tackling Resistance to PI3K Inhibition by Targeting the Epigenome. *Cancer Cell* *31*, 616–618.
- Kraft, S., and Fletcher, C.D.M. (2011). Atypical intradermal smooth muscle neoplasms: clinicopathologic analysis of 84 cases and a reappraisal of cutaneous “leiomyosarcoma.” *Am. J. Surg. Pathol.* *35*, 599–607.
- Kurosu, H., Maehama, T., Okada, T., Yamamoto, T., Hoshino, S., Fukui, Y., Ui, M., Hazeki, O., and Katada, T. (1997). Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110beta is synergistically activated by the betagamma subunits of G proteins and phosphotyrosyl peptide. *J. Biol. Chem.* *272*, 24252–24256.
- Lake, D., Corrêa, S.A.L., and Müller, J. (2016). Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *73*, 4397–4413.
- Lakhanpal, G.K., Vecchiarelli-Federico, L.M., Li, Y.-J., Cui, J.-W., Bailey, M.L., Spaner, D.E., Dumont, D.J., Barber, D.L., and Ben-David, Y. (2010). The inositol phosphatase SHIP-1 is negatively regulated by Fli-1 and its loss accelerates leukemogenesis. *Blood* *116*, 428–436.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2009). An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr. Biol. CB* *19*, R1046-1052.
- Larramendy, M.L., Kaur, S., Svarvar, C., Böhling, T., and Knuutila, S. (2006). Gene copy number profiling of soft-tissue leiomyosarcomas by array-comparative genomic hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* *169*, 94–101.
- Laskin, W.B., Fanburg-Smith, J.C., Burke, A.P., Kraszewska, E., Fetsch, J.F., and Miettinen, M. (2010). Leiomyosarcoma of the inferior vena cava: clinicopathologic study of 40 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* *34*, 873–881.

- Le, X., Antony, R., Razavi, P., Treacy, D.J., Luo, F., Ghandi, M., Castel, P., Scaltriti, M., Baselga, J., and Garraway, L.A. (2016). Systematic Functional Characterization of Resistance to PI3K Inhibition in Breast Cancer. *Cancer Discov.* 6, 1134–1147.
- Le Cesne, A., and Reichardt, P. (2015). Optimizing the use of trabectedin for advanced soft tissue sarcoma in daily clinical practice. *Future Oncol. Lond. Engl.* 11, 3–14.
- Le Cesne, A., Cresta, S., Maki, R.G., Blay, J.Y., Verweij, J., Poveda, A., Casali, P.G., Balaña, C., Schöffski, P., Grosso, F., et al. (2012). A retrospective analysis of antitumour activity with trabectedin in translocation-related sarcomas. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 48, 3036–3044.
- Lee, C.-H., Yu, C.-C., Wang, B.-Y., and Chang, W.-W. (2015a). Tumorsphere as an effective in vitro platform for screening anti-cancer stem cell drugs. *Oncotarget* 7, 1215–1226.
- Lee, E.S., Locker, J., Nalesnik, M., Reyes, J., Jaffe, R., Alashari, M., Nour, B., Tzakis, A., and Dickman, P.S. (1995). The association of Epstein-Barr virus with smooth-muscle tumors occurring after organ transplantation. *N. Engl. J. Med.* 332, 19–25.
- Lee, M.-S., Jeong, M.-H., Lee, H.-W., Han, H.-J., Ko, A., Hewitt, S.M., Kim, J.-H., Chun, K.-H., Chung, J.-Y., Lee, C., et al. (2015b). PI3K/AKT activation induces PTEN ubiquitination and destabilization accelerating tumorigenesis. *Nat. Commun.* 6, 7769.
- Lee, P.J., Yoo, N.S., Hagemann, I.S., Pfeifer, J.D., Cottrell, C.E., Abel, H.J., and Duncavage, E.J. (2017). Spectrum of mutations in leiomyosarcomas identified by clinical targeted next-generation sequencing. *Exp. Mol. Pathol.* 102, 156–161.
- Lee, S.-R., Yang, K.-S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., and Rhee, S.G. (2002). Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 277, 20336–20342.
- Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27–42.
- Li, X., and Gao, T. (2014). mTORC2 phosphorylates protein kinase C $\zeta$  to regulate its stability and activity. *EMBO Rep.* 15, 191–198.
- Li, C., Xin, P., Xiao, H., Zheng, Y., Huang, Y., and Zhu, X. (2015). The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 inhibits proliferation and induces apoptosis of burkitt lymphoma cells. *Cancer Cell Int.* 15, 65.
- Li, H., Jin, X., Zhang, Z., Xing, Y., and Kong, X. (2013). Inhibition of autophagy enhances apoptosis induced by the PI3K/AKT/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 in renal cell carcinoma cells. *Cell Biochem. Funct.* 31, 427–433.
- Li, W., Petrimpol, M., Molle, K.D., Hall, M.N., Battagay, E.J., and Humar, R. (2007). Hypoxia-induced endothelial proliferation requires both mTORC1 and mTORC2. *Circ. Res.* 100, 79–87.
- Li, Z., Dong, X., Dong, X., Wang, Z., Liu, W., Deng, N., Ding, Y., Tang, L., Hla, T., Zeng, R., et al. (2005). Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat. Cell Biol.* 7, 399–404.
- Liao, Y., and Hung, M.-C. (2010). Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am. J. Transl. Res.* 2, 19–42.



- Liau, J.-Y., Tsai, J.-H., Jeng, Y.-M., Lee, J.-C., Hsu, H.-H., and Yang, C.-Y. (2015). Leiomyosarcoma with alternative lengthening of telomeres is associated with aggressive histologic features, loss of ATRX expression, and poor clinical outcome. *Am. J. Surg. Pathol.* 39, 236–244.
- Liu, P., Gan, W., Inuzuka, H., Lazorchak, A.S., Gao, D., Arojo, O., Liu, D., Wan, L., Zhai, B., Yu, Y., et al. (2013). Sin1 phosphorylation impairs mTORC2 complex integrity and inhibits downstream Akt signalling to suppress tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* 15, 1340–1350.
- Liu, P., Begley, M., Michowski, W., Inuzuka, H., Ginzberg, M., Gao, D., Tsou, P., Gan, W., Papa, A., Kim, B.M., et al. (2014). Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. *Nature* 508, 541–545.
- Liu, P., Gan, W., Chin, Y.R., Ogura, K., Guo, J., Zhang, J., Wang, B., Blenis, J., Cantley, L.C., Toker, A., et al. (2015). PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-Dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex. *Cancer Discov.* 5, 1194–1209.
- Lorenz, M.C., and Heitman, J. (1995). TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKBP12-rapamycin. *J. Biol. Chem.* 270, 27531–27537.
- Lu, J., Jeong, H.-W., Jeong, H., Kong, N., Yang, Y., Carroll, J., Luo, H.R., Silberstein, L.E., Yupoma, null, and Chai, L. (2009). Stem cell factor SALL4 represses the transcriptions of PTEN and SALL1 through an epigenetic repressor complex. *PloS One* 4, e5577.
- Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., et al. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 350, 2129–2139.
- Maccario, H., Perera, N.M., Gray, A., Downes, C.P., and Leslie, N.R. (2010). Ubiquitination of PTEN (phosphatase and tensin homolog) inhibits phosphatase activity and is enhanced by membrane targeting and hyperosmotic stress. *J. Biol. Chem.* 285, 12620–12628.
- Maehama, T., and Dixon, J.E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 13375–13378.
- Maeno, Y., Li, Q., Park, K., Rask-Madsen, C., Gao, B., Matsumoto, M., Liu, Y., Wu, I.-H., White, M.F., Feener, E.P., et al. (2012). Inhibition of insulin signaling in endothelial cells by protein kinase C-induced phosphorylation of p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). *J. Biol. Chem.* 287, 4518–4530.
- Maier, U., Babich, A., and Nürnberg, B. (1999). Roles of non-catalytic subunits in gbetagamma-induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. *J. Biol. Chem.* 274, 29311–29317.
- Maira, S.-M., Stauffer, F., Brueggen, J., Furet, P., Schnell, C., Fritsch, C., Brachmann, S., Chène, P., De Pover, A., Schoemaker, K., et al. (2008). Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol. Cancer Ther.* 7, 1851–1863.

- Maira, S.-M., Pecchi, S., Huang, A., Burger, M., Knapp, M., Sterker, D., Schnell, C., Guthy, D., Nagel, T., Wiesmann, M., et al. (2012). Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* *11*, 317–328.
- Majumder, P.K., Febbo, P.G., Bikoff, R., Berger, R., Xue, Q., McMahon, L.M., Manola, J., Brugarolas, J., McDonnell, T.J., Golub, T.R., et al. (2004). mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nat. Med.* *10*, 594–601.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* *129*, 1261–1274.
- Manning, B.D., and Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* *169*, 381–405.
- Mao, M., Liu, Y., and Gao, X. (2017). Feedback autophagy activation as a key resistance factor of Ku-0060648 in colorectal cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *490*, 1244–1249.
- Marone, R., Cmiljanovic, V., Giese, B., and Wymann, M.P. (2008). Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim. Biophys. Acta* *1784*, 159–185.
- Martin, J.L., and Baxter, R.C. (2007). Expression of insulin-like growth factor binding protein-2 by MCF-7 breast cancer cells is regulated through the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/mammalian target of rapamycin pathway. *Endocrinology* *148*, 2532–2541.
- Martin, L.-A., André, F., Campone, M., Bachelot, T., and Jerusalem, G. (2013). mTOR inhibitors in advanced breast cancer: ready for prime time? *Cancer Treat. Rev.* *39*, 742–752.
- Massard, C., Chi, K.N., Castellano, D., de Bono, J., Gravis, G., Dirix, L., Machiels, J.-P., Mita, A., Gonzalez, B.M., Turri, S., et al. (2017). Phase Ib dose-finding study of abiraterone acetate plus buparlisib (BKM120) or dactolisib (BEZ235) in patients with castration-resistant prostate cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *76*, 36–44.
- Masui, K., Tanaka, K., Akhavan, D., Babic, I., Gini, B., Matsutani, T., Iwanami, A., Liu, F., Villa, G.R., Gu, Y., et al. (2013). mTOR complex 2 controls glycolytic metabolism in glioblastoma through FoxO acetylation and upregulation of c-Myc. *Cell Metab.* *18*, 726–739.
- Mateo, J., Ganji, G., Lemech, C., Burris, H.A., Han, S.-W., Swales, K., Decordova, S., DeYoung, M.P., Smith, D.A., Kalyana-Sundaram, S., et al. (2017). A First-Time-in-Human Study of GSK2636771, a Phosphoinositide 3 Kinase Beta-Selective Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*
- Mavrakis, K.J., Wolfe, A.L., Oricchio, E., Palomero, T., de Keersmaecker, K., McJunkin, K., Zuber, J., James, T., Khan, A.A., Leslie, C.S., et al. (2010). Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Cell Biol.* *12*, 372–379.
- McClain, K.L., Leach, C.T., Jenson, H.B., Joshi, V.V., Pollock, B.H., Parmley, R.T., DiCarlo, F.J., Chadwick, E.G., and Murphy, S.B. (1995). Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in young people with AIDS. *N. Engl. J. Med.* *332*, 12–18.

- Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., and Codogno, P. (2010). Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res.* 20, 748–762.
- Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S.T., and Patel, T. (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 133, 647–658.
- Meza-Zepeda, L.A., Kresse, S.H., Barragan-Polania, A.H., Bjerkehagen, B., Ohnstad, H.O., Namløs, H.M., Wang, J., Kristiansen, B.E., and Myklebost, O. (2006). Array Comparative Genomic Hybridization Reveals Distinct DNA Copy Number Differences between Gastrointestinal Stromal Tumors and Leiomyosarcomas. *Cancer Res.* 66, 8984–8993.
- Miettinen, M., and Fetsch, J.F. (2006). Evaluation of biological potential of smooth muscle tumours. *Histopathology* 48, 97–105.
- Millis, S.Z., Ikeda, S., Reddy, S., Gatalica, Z., and Kurzrock, R. (2016). Landscape of Phosphatidylinositol-3-Kinase Pathway Alterations Across 19 784 Diverse Solid Tumors. *JAMA Oncol.* 2, 1565–1573.
- Miyajima, K., Oda, Y., Tamiya, S., Shimizu, K., Hachitanda, Y., and Tsuneyoshi, M. (2003). Cytogenetic and clinicopathological analysis of soft-tissue leiomyosarcomas. *Pathol. Int.* 53, 163–168.
- Mountford, J.C. (2008). Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfus. Med. Oxf. Engl.* 18, 1–12.
- Nakanishi, Y., Walter, K., Spoerke, J.M., O'Brien, C., Huw, L.Y., Hampton, G.M., and Lackner, M.R. (2016). Activating Mutations in PIK3CB Confer Resistance to PI3K Inhibition and Define a Novel Oncogenic Role for p110 $\beta$ . *Cancer Res.* 76, 1193–1203.
- Neuville, A., Ranchère-Vince, D., Dei Tos, A.P., Montesco, M.C., Hostein, I., Toffolatti, L., Chibon, F., Pissaloux, D., Alberti, L., Decouvelaere, A.-V., et al. (2013). Impact of molecular analysis on the final sarcoma diagnosis: a study on 763 cases collected during a European epidemiological study. *Am. J. Surg. Pathol.* 37, 1259–1268.
- Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2003). The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J. Biol. Chem.* 278, 15461–15464.
- Nungaray, N., Arriola, M., Gutierrez, M.J., Oliva, E., Hernández, E., Gonzalez, E., Andres, A., and Morales, J.M. (2005). Rapamycin at Six Years Can Exhibit Normal Renal Function Without Proteinuria or Neoplasia After Renal Transplantation. A Single-Center Experience. *Transplant. Proc.* 37, 3727–3728.
- Nussbaum, D.P., Rushing, C.N., Lane, W.O., Cardona, D.M., Kirsch, D.G., Peterson, B.L., and Blazer, D.G. (2016). Preoperative or postoperative radiotherapy versus surgery alone for retroperitoneal sarcoma: a case-control, propensity score-matched analysis of a nationwide clinical oncology database. *Lancet Oncol.* 17, 966–975.

- Nyström, H., Jönsson, M., Werner-Hartman, L., Nilbert, M., and Carneiro, A. (2017). Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  predicts recurrence in high-grade soft tissue sarcoma of extremities and trunk wall. *J. Clin. Pathol.*
- O'Brien, C.A., Kreso, A., and Jamieson, C.H.M. (2010). Cancer stem cells and self-renewal. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 3113–3120.
- O'Carroll, D., Erhardt, S., Pagani, M., Barton, S.C., Surani, M.A., and Jenuwein, T. (2001). The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 4330–4336.
- Okumura, K., Mendoza, M., Bachoo, R.M., DePinho, R.A., Cavenee, W.K., and Furnari, F.B. (2006). PCAF modulates PTEN activity. *J. Biol. Chem.* *281*, 26562–26568.
- Oliveras-Ferraro, C., Vazquez-Martin, A., Cuyàs, E., Corominas-Faja, B., Rodríguez-Gallego, E., Fernández-Arroyo, S., Martín-Castillo, B., Joven, J., and Menendez, J.A. (2014). Acquired resistance to metformin in breast cancer cells triggers transcriptome reprogramming toward a degradome-related metastatic stem-like profile. *Cell Cycle Georget. Tex* *13*, 1132–1144.
- Onishi-Haraikawa, Y., Funaki, M., Gotoh, N., Shibuya, M., Inukai, K., Katagiri, H., Fukushima, Y., Anai, M., Ogihara, T., Sakoda, H., et al. (2001). Unique phosphorylation mechanism of Gab1 using PI 3-kinase as an adaptor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *288*, 476–482.
- Orme, M.H., Alrubaie, S., Bradley, G.L., Walker, C.D., and Leever, S.J. (2006). Input from Ras is required for maximal PI(3)K signalling in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1298–1302.
- Pacold, M.E., Suire, S., Perisic, O., Lara-Gonzalez, S., Davis, C.T., Walker, E.H., Hawkins, P.T., Stephens, L., Eccleston, J.F., and Williams, R.L. (2000). Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell* *103*, 931–943.
- Panagopoulos, I., Lassen, C., Isaksson, M., Mitelman, F., Mandahl, N., and Aman, P. (1997). Characteristic sequence motifs at the breakpoints of the hybrid genes FUS/CHOP, EWS/CHOP and FUS/ERG in myxoid liposarcoma and acute myeloid leukemia. *Oncogene* *15*, 1357–1362.
- Papadopoulos, K.P., Egile, C., Ruiz-Soto, R., Jiang, J., Shi, W., Bentzien, F., Rasco, D., Abrisqueta, P., Vose, J.M., and Taberero, J. (2015). Efficacy, safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of SAR245409 (voxtalisib, XL765), an orally administered phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor: a phase 1 expansion cohort in patients with relapsed or refractory lymphoma. *Leuk. Lymphoma* *56*, 1763–1770.
- Paulsen, I.T., Park, J.H., Choi, P.S., and Saier, M.H. (1997). A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* *156*, 1–8.
- Pautier, P., Floquet, A., Penel, N., Piperno-Neumann, S., Isambert, N., Rey, A., Bompas, E., Cioffi, A., Delcambre, C., Cupissol, D., et al. (2012). Randomized multicenter and stratified phase II study of gemcitabine alone versus gemcitabine and docetaxel in patients with metastatic or relapsed leiomyosarcomas: a Federation Nationale des Centres de Lutte Contre

le Cancer (FNCLCC) French Sarcoma Group Study (TAXOGEM study). *The Oncologist* 17, 1213–1220.

Pearce, L.R., Komander, D., and Alessi, D.R. (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 9–22.

Pemov, A., Li, H., Patidar, R., Hansen, N.F., Sindiri, S., Hartley, S.W., Wei, J.S., Elkahloun, A., Chandrasekharappa, S.C., NISC Comparative Sequencing Program, et al. (2017). The primacy of NF1 loss as the driver of tumorigenesis in neurofibromatosis type 1-associated plexiform neurofibromas. *Oncogene* 36, 3168–3177.

Pérot, G., Derré, 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.

Pérot, G., Chibon, F., Montero, A., Lagarde, P., de Thé, H., Terrier, P., Guillou, L., Ranchère, D., Coindre, J.-M., and Aurias, A. (2010). Constant p53 Pathway Inactivation in a Large Series of Soft Tissue Sarcomas with Complex Genetics. *Am. J. Pathol.* 177, 2080–2090.

Peterson, R.T., and Schreiber, S.L. (1999). Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr. Biol. CB* 9, R521-524.

Peterson, T.R., Laplante, M., Thoreen, C.C., Sancak, Y., Kang, S.A., Kuehl, W.M., Gray, N.S., and Sabatini, D.M. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137, 873–886.

Pike, K.G., Malagu, K., Hummersone, M.G., Menear, K.A., Duggan, H.M.E., Gomez, S., Martin, N.M.B., Ruston, L., Pass, S.L., and Pass, M. (2013). Optimization of potent and selective dual mTORC1 and mTORC2 inhibitors: the discovery of AZD8055 and AZD2014. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 1212–1216.

Pintus, G., Tadolini, B., Posadino, A.M., Sanna, B., Debidda, M., Bennardini, F., Sava, G., and Ventura, C. (2002). Inhibition of the MEK/ERK signaling pathway by the novel antimetastatic agent NAMI-A down regulates c-myc gene expression and endothelial cell proliferation. *Eur. J. Biochem.* 269, 5861–5870.

Poulain, L., Sujobert, P., Zylbersztejn, F., Barreau, S., Stuani, L., Lambert, M., Palama, T.L., Chesnais, V., Birsén, R., Vergez, F., et al. (2017). High mTORC1 activity drives glycolysis addiction and sensitivity to G6PD inhibition in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*.

Puissant, A., Fenouille, N., and Auberger, P. (2012). When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *Am. J. Cancer Res.* 2, 397–413.

Ragon, B.K., Kantarjian, H., Jabbour, E., Ravandi, F., Cortes, J., Borthakur, G., DeBose, L., Zeng, Z., Schneider, H., Pemmaraju, N., et al. (2017). Buparlisib, a PI3K inhibitor, demonstrates acceptable tolerability and preliminary activity in a phase I trial of patients with advanced leukemias. *Am. J. Hematol.* 92, 7–11.

Ramanathan, A., and Schreiber, S.L. (2009). Direct control of mitochondrial function by mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 22229–22232.

- Ramos, J.W. (2008). The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 2707–2719.
- Ramos, F.J., Kaeberlein, M., and Kennedy, B.K. (2013). Elevated mTORC1 signaling and impaired autophagy. *Autophagy* *9*, 108–109.
- Raymond, E., Alexandre, J., Faivre, S., Vera, K., Materman, E., Boni, J., Leister, C., Korth-Bradley, J., Hanauske, A., and Armand, J.-P. (2004). Safety and pharmacokinetics of escalated doses of weekly intravenous infusion of CCI-779, a novel mTOR inhibitor, in patients with cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *22*, 2336–2347.
- Read, R.D., Cavenee, W.K., Furnari, F.B., and Thomas, J.B. (2009). A drosophila model for EGFR-Ras and PI3K-dependent human glioma. *PLoS Genet.* *5*, e1000374.
- Reichardt, P., Demetri, G.D., Gelderblom, H., Rutkowski, P., Im, S.-A., Gupta, S., Kang, Y.-K., Schöffski, P., Schuette, J., Soulières, D., et al. (2016). Correlation of KIT and PDGFRA mutational status with clinical benefit in patients with gastrointestinal stromal tumor treated with sunitinib in a worldwide treatment-use trial. *BMC Cancer* *16*.
- Robin, Y.-M., Penel, N., Pérot, G., Neuville, A., Vélasco, V., Ranchère-Vince, D., Terrier, P., and Coindre, J.-M. (2013). Transgelin is a novel marker of smooth muscle differentiation that improves diagnostic accuracy of leiomyosarcomas: a comparative immunohistochemical reappraisal of myogenic markers in 900 soft tissue tumors. *Mod. Pathol.* *26*, 502–510.
- Rodon, J., Dienstmann, R., Serra, V., and Tabernero, J. (2013). Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *10*, 143–153.
- Rosemann, M., Gonzalez-Vasconcellos, I., Domke, T., Kuosaitis, V., Schneider, R., Kremer, M., Favor, J., Nathrath, M., and Atkinson, M.J. (2014). A Rb1 promoter variant with reduced activity contributes to osteosarcoma susceptibility in irradiated mice. *Mol. Cancer* *13*, 182.
- Roux, P.P., Ballif, B.A., Anjum, R., Gygi, S.P., and Blenis, J. (2004). Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 13489–13494.
- Sabers, C.J., Martin, M.M., Brunn, G.J., Williams, J.M., Dumont, F.J., Wiederrecht, G., and Abraham, R.T. (1995). Isolation of a Protein Target of the FKBP12-Rapamycin Complex in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* *270*, 815–822.
- Saini, K.S., Loi, S., de Azambuja, E., Metzger-Filho, O., Saini, M.L., Ignatiadis, M., Dancey, J.E., and Piccart-Gebhart, M.J. (2013). Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* *39*, 935–946.
- Salphati, L., Lee, L.B., Pang, J., Plise, E.G., and Zhang, X. (2010). Role of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein-1 in the brain penetration and brain pharmacodynamic activity of the novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor GDC-0941. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *38*, 1422–1426.
- Sangai, T., Akcakanat, A., Chen, H., Tarco, E., Wu, Y., Do, K.-A., Miller, T.W., Arteaga, C.L., Mills, G.B., Gonzalez-Angulo, A.M., et al. (2012). Biomarkers of response to Akt inhibitor MK-2206 in breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 5816–5828.

- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* *307*, 1098–1101.
- Sarker, D., Ang, J.E., Baird, R., Kristeleit, R., Shah, K., Moreno, V., Clarke, P.A., Raynaud, F.I., Levy, G., Ware, J.A., et al. (2015). First-in-human phase I study of pictilisib (GDC-0941), a potent pan-class I phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *21*, 77–86.
- Saura, C., Roda, D., Roselló, S., Oliveira, M., Macarulla, T., Pérez-Fidalgo, J.A., Morales-Barrera, R., Sanchis-García, J.M., Musib, L., Budha, N., et al. (2017). A First-in-Human Phase I Study of the ATP-Competitive AKT Inhibitor Ipatasertib Demonstrates Robust and Safe Targeting of AKT in Patients with Solid Tumors. *Cancer Discov.* *7*, 102–113.
- Savina, M., Le Cesne, A., Blay, J.-Y., Ray-Coquard, I., Mir, O., Toulmonde, M., Cousin, S., Terrier, P., Ranchere-Vince, D., Meeus, P., et al. (2017). Patterns of care and outcomes of patients with METAstatic soft tissue SARComa in a real-life setting: the METASARC observational study. *BMC Med.* *15*, 78.
- Saxton, R.A., and Sabatini, D.M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* *168*, 960–976.
- Scheeff, E.D., and Bourne, P.E. (2005). Structural evolution of the protein kinase-like superfamily. *PLoS Comput. Biol.* *1*, e49.
- Schubbert, S., Shannon, K., and Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 295–308.
- Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., and Nevins, J.R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev.* *14*, 2501–2514.
- Seront, E., Rottey, S., Filleul, B., Glorieux, P., Goeminne, J.-C., Verschaeve, V., Vandembulcke, J.-M., Sautois, B., Boegner, P., Gillain, A., et al. (2016). Phase II study of dual phosphoinositol-3-kinase (PI3K) and mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor BEZ235 in patients with locally advanced or metastatic transitional cell carcinoma. *BJU Int.* *118*, 408–415.
- Setsu, N., Yamamoto, H., Kohashi, K., Endo, M., Matsuda, S., Yokoyama, R., Nishiyama, K., Iwamoto, Y., Dobashi, Y., and Oda, Y. (2012). The Akt/mammalian target of rapamycin pathway is activated and associated with adverse prognosis in soft tissue leiomyosarcomas. *Cancer* *118*, 1637–1648.
- Shapiro, G.I., Rodon, J., Bedell, C., Kwak, E.L., Baselga, J., Braña, I., Pandya, S.S., Scheffold, C., Laird, A.D., Nguyen, L.T., et al. (2014). Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of SAR245408 (XL147), an oral pan-class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *20*, 233–245.
- Shen, W.H., Balajee, A.S., Wang, J., Wu, H., Eng, C., Pandolfi, P.P., and Yin, Y. (2007). Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* *128*, 157–170.

- Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103–112.
- Shi, Y., Paluch, B.E., Wang, X., and Jiang, X. (2012). PTEN at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 4687–4692.
- Shim, E.K., Jung, S.H., and Lee, J.R. (2011). Role of two adaptor molecules SLP-76 and LAT in the PI3K signaling pathway in activated T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 2926–2935.
- Shimizu, T., Tolcher, A.W., Papadopoulos, K.P., Beeram, M., Rasco, D.W., Smith, L.S., Gunn, S., Smetzer, L., Mays, T.A., Kaiser, B., et al. (2012). The clinical effect of the dual-targeting strategy involving PI3K/AKT/mTOR and RAS/MEK/ERK pathways in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 2316–2325.
- Shin, S.-Y., Rath, O., Zebisch, A., Choo, S.-M., Kolch, W., and Cho, K.-H. (2010). Functional roles of multiple feedback loops in extracellular signal-regulated kinase and Wnt signaling pathways that regulate epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 70, 6715–6724.
- 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.
- Sleeman, M.W., Wortley, K.E., Lai, K.-M.V., Gowen, L.C., Kintner, J., Kline, W.O., Garcia, K., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D., Wiegand, S.J., et al. (2005). Absence of the lipid phosphatase SHIP2 confers resistance to dietary obesity. *Nat. Med.* 11, 199–205.
- Slimane, M., Yahia, N.B., Bouaziz, H., Bouzaine, H., Benhassouna, J., Dhieb, T.B., Hechiche, M., Gammoudi, A., and Rahal, K. (2016). Inferior vena cava leiomyosarcoma: vascular reconstruction is not always mandatory. *Pan Afr. Med. J.* 24, 287.
- Smith, L.M., Nesterova, A., Ryan, M.C., Duniho, S., Jonas, M., Anderson, M., Zabinski, R.F., Sutherland, M.K., Gerber, H.-P., Van Orden, K.L., et al. (2008). CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers. *Br. J. Cancer* 99, 100–109.
- Soares, H.P., Ming, M., Mellon, M., Young, S.H., Han, L., Sinnet-Smith, J., and Rozengurt, E. (2015). Dual PI3K/mTOR Inhibitors Induce Rapid Overactivation of the MEK/ERK Pathway in Human Pancreatic Cancer Cells through Suppression of mTORC2. *Mol. Cancer Ther.* 14, 1014–1023.
- Song, M.S., Salmena, L., and Pandolfi, P.P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 283–296.
- Stauffer, F., Garcia-Echeverria, C., Furet, P., Schnell, C., Ruetz, S., Maira, M., and Fritsch, C. (2007). Biochemical, cellular and in vivo profiling of a new PI3K inhibitor from the imidazoquinoline series. *Cancer Res.* 67, 269–269.



- Stephens, L.R., Eguinoa, A., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Cooke, F., Coadwell, J., Smrcka, A.S., Thelen, M., Cadwallader, K., Tempst, P., et al. (1997). The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 89, 105–114.
- Stiller, C.A., Trama, A., Serraino, D., Rossi, S., Navarro, C., Chirlaque, M.D., Casali, P.G., and RARECARE Working Group (2013). Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: report from the RARECARE project. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 49, 684–695.
- Storms, R.W., Trujillo, A.P., Springer, J.B., Shah, L., Colvin, O.M., Ludeman, S.M., and Smith, C. (1999). Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9118–9123.
- Stratton, M.R., Williams, S., Fisher, C., Ball, A., Westbury, G., Gusterson, B.A., Fletcher, C.D., Knight, J.C., Fung, Y.K., and Reeves, B.R. (1989). Structural alterations of the RB1 gene in human soft tissue tumours. *Br. J. Cancer* 60, 202–205.
- Sun, Y., Jiang, Y., Huang, J., Chen, H., Liao, Y., and Yang, Z. (2017). CISD2 enhances the chemosensitivity of gastric cancer through the enhancement of 5-FU-induced apoptosis and the inhibition of autophagy by AKT/mTOR pathway. *Cancer Med.*
- Suvà, M.-L., Riggi, N., Stehle, J.-C., Baumer, K., Tercier, S., Joseph, J.-M., Suvà, D., Clément, V., Provero, P., Cironi, L., et al. (2009). Identification of cancer stem cells in Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* 69, 1776–1781.
- Szakács, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C., and Gottesman, M.M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 219–234.
- Tallman, M.S., Nabhan, C., Feusner, J.H., and Rowe, J.M. (2002). Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies. *Blood* 99, 759–767.
- Tamura, M., Gu, J., Takino, T., and Yamada, K.M. (1999). Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res.* 59, 442–449.
- Tanaka, K., Babic, I., Nathanson, D., Akhavan, D., Guo, D., Gini, B., Dang, J., Zhu, S., Yang, H., De Jesus, J., et al. (2011). Oncogenic EGFR signaling activates an mTORC2-NF-κB pathway that promotes chemotherapy resistance. *Cancer Discov.* 1, 524–538.
- Tang, S.C., Sparidans, R.W., Cheung, K.L., Fukami, T., Durmus, S., Wagenaar, E., Yokoi, T., van Vlijmen, B.J.M., Beijnen, J.H., and Schinkel, A.H. (2014). P-glycoprotein, CYP3A, and plasma carboxylesterase determine brain and blood disposition of the mTOR Inhibitor everolimus (Afinitor) in mice. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 20, 3133–3145.
- Tawfik, O., Rao, D., Nothnick, W.B., Graham, A., Mau, B., and Fan, F. (2014). Transgelin, a Novel Marker of Smooth Muscle Differentiation, Effectively Distinguishes Endometrial Stromal Tumors from Uterine Smooth Muscle Tumors. *Int. J. Gynecol. Obstet. Reprod. Med. Res.* 1, 26–31.
- Teachey, D.T., Grupp, S.A., and Brown, V.I. (2009). Mammalian target of rapamycin inhibitors and their potential role in therapy in leukaemia and other haematological malignancies. *Br. J. Haematol.* 145, 569–580.

- Temraz, S., Mukherji, D., and Shamseddine, A. (2015). Dual Inhibition of MEK and PI3K Pathway in KRAS and BRAF Mutated Colorectal Cancers. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 22976–22988.
- Thomanetz, V., Angliker, N., Cloëtta, D., Lustenberger, R.M., Schweighauser, M., Oliveri, F., Suzuki, N., and Rüegg, M.A. (2013). Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology. *J. Cell Biol.* *201*, 293–308.
- Tirino, V., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., Papaccio, F., Fazioli, F., Pirozzi, G., and Papaccio, G. (2011). Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *25*, 2022–2030.
- Toker, A., and Newton, A.C. (2000). Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J. Biol. Chem.* *275*, 8271–8274.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* *65*, 87–108.
- 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.
- Tsukamoto, S., Huang, Y., Umeda, D., Yamada, S., Yamashita, S., Kumazoe, M., Kim, Y., Murata, M., Yamada, K., and Tachibana, H. (2014). 67-kDa laminin receptor-dependent protein phosphatase 2A (PP2A) activation elicits melanoma-specific antitumor activity overcoming drug resistance. *J. Biol. Chem.* *289*, 32671–32681.
- Vadas, O., Burke, J.E., Zhang, X., Berndt, A., and Williams, R.L. (2011). Structural basis for activation and inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases. *Sci. Signal.* *4*, re2.
- Vander Haar, E., Lee, S.-I., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., and Kim, D.-H. (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell Biol.* *9*, 316–323.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., and Bilanges, B. (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 329–341.
- Vazquez, F., Grossman, S.R., Takahashi, Y., Rokas, M.V., Nakamura, N., and Sellers, W.R. (2001). Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J. Biol. Chem.* *276*, 48627–48630.
- Vergès, B., Walter, T., and Cariou, B. (2014). Endocrine side effects of anti-cancer drugs: effects of anti-cancer targeted therapies on lipid and glucose metabolism. *Eur. J. Endocrinol.* *170*, R43-55.
- Vilar, E., Perez-Garcia, J., and Tabernero, J. (2011). Pushing the envelope in the mTOR pathway: the second generation of inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* *10*, 395–403.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 489–501.

- van der Vos, K.E., and Coffey, P.J. (2011). The extending network of FOXO transcriptional target genes. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 579–592.
- Walker, E.H., Pacold, M.E., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, P.T., Wymann, M.P., and Williams, R.L. (2000). Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol. Cell* *6*, 909–919.
- Walter, D., Satheesha, S., Albrecht, P., Bornhauser, B.C., D'Alessandro, V., Oesch, S.M., Rehrauer, H., Leuschner, I., Koscielniak, E., Gengler, C., et al. (2011). CD133 positive embryonal rhabdomyosarcoma stem-like cell population is enriched in rhabdospheres. *PLoS One* *6*, e19506.
- Wang, L., Park, P., Zhang, H., La Marca, F., and Lin, C.-Y. (2011). Prospective identification of tumorigenic osteosarcoma cancer stem cells in OS99-1 cells based on high aldehyde dehydrogenase activity. *Int. J. Cancer* *128*, 294–303.
- 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, R., Titley, J.C., Lu, Y.-J., Summersgill, B.M., Bridge, J.A., Fisher, C., and Shipley, J. (2003). Loss of 13q14-q21 and gain of 5p14-pter in the progression of leiomyosarcoma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* *16*, 778–785.
- Webb, A.E., and Brunet, A. (2014). FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem. Sci.* *39*, 159–169.
- Weiler, M., Blaes, J., Pusch, S., Sahm, F., Czabanka, M., Luger, S., Bunse, L., Solecki, G., Eichwald, V., Jugold, M., et al. (2014). mTOR target NDRG1 confers MGMT-dependent resistance to alkylating chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 409–414.
- Whelan, J.T., Forbes, S.L., and Bertrand, F.E. (2007). CBF-1 (RBP-J kappa) binds to the PTEN promoter and regulates PTEN gene expression. *Cell Cycle Georget. Tex* *6*, 80–84.
- White, E.J., Martin, V., Liu, J.-L., Klein, S.R., Piya, S., Gomez-Manzano, C., Fueyo, J., and Jiang, H. (2011). Autophagy regulation in cancer development and therapy. *Am. J. Cancer Res.* *1*, 362–372.
- Wibmer, C., Leithner, A., Zielonke, N., Sperl, M., and Windhager, R. (2010). Increasing incidence rates of soft tissue sarcomas? A population-based epidemiologic study and literature review. *Ann. Oncol.* *21*, 1106–1111.
- Wu, C.-P., Hsieh, C.-H., and Wu, Y.-S. (2011). The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy. *Mol. Pharm.* *8*, 1996–2011.
- Wu, C.-P., Murakami, M., Hsiao, S.-H., Chou, A.-W., Li, Y.-Q., Huang, Y.-H., Hung, T.-H., and Ambudkar, S.V. (2017a). Overexpression of ATP-Binding Cassette Subfamily G Member 2 Confers Resistance to Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor PF-4989216 in Cancer Cells. *Mol. Pharm.* *14*, 2368–2377.

- Wu, L., Feng, Z., Cui, S., Hou, K., Tang, L., Zhou, J., Cai, G., Xie, Y., Hong, Q., Fu, B., et al. (2013). Rapamycin upregulates autophagy by inhibiting the mTOR-ULK1 pathway, resulting in reduced podocyte injury. *PLoS One* 8, e63799.
- Wu, Y.L., Maachani, U.B., Schweitzer, M., Singh, R., Wang, M., Chang, R., and Souweidane, M.M. (2017b). Dual Inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK Pathways Induces Synergistic Antitumor Effects in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Cells. *Transl. Oncol.* 10, 221–228.
- Xia, D., Srinivas, H., Ahn, Y.-H., Sethi, G., Sheng, X., Yung, W.K.A., Xia, Q., Chiao, P.J., Kim, H., Brown, P.H., et al. (2007). Mitogen-activated protein kinase kinase-4 promotes cell survival by decreasing PTEN expression through an NF kappa B-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 282, 3507–3519.
- Yang, C., Peng, J., Jiang, W., Zhang, Y., Chen, X., Wu, X., Zhu, Y., Zhang, H., Chen, J., Wang, J., et al. (2013a). mTOR activation in immature cells of primary nasopharyngeal carcinoma and anti-tumor effect of rapamycin in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* 341, 186–194.
- Yang, G., Murashige, D.S., Humphrey, S.J., and James, D.E. (2015). A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep.* 12, 937–943.
- Yang, H., Rudge, D.G., Koos, J.D., Vaidialingam, B., Yang, H.J., and Pavletich, N.P. (2013b). mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* 497, 217–223.
- Yang, J., Du, X., Chen, K., Ylipää, A., Lazar, A.J.F., Trent, J., Lev, D., Pollock, R., Hao, X., Hunt, K., et al. (2009). Genetic aberrations in soft tissue leiomyosarcoma. *Cancer Lett.* 275, 1–8.
- Yap, T.A., Yan, L., Patnaik, A., Fearen, I., Olmos, D., Papadopoulos, K., Baird, R.D., Delgado, L., Taylor, A., Lupinacci, L., et al. (2011). First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 4688–4695.
- Zeliadt, N.A., Mauro, L.J., and Wattenberg, E.V. (2008). Reciprocal regulation of extracellular signal regulated kinase 1/2 and mitogen activated protein kinase phosphatase-3. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232, 408–417.
- Zhang, H., Bajraszewski, N., Wu, E., Wang, H., Moseman, A.P., Dabora, S.L., Griffin, J.D., and Kwiatkowski, D.J. (2007). PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. *J. Clin. Invest.* 117, 730–738.
- Zhang, Q., Ubago, J., Li, L., Guo, H., Liu, Y., Qiang, W., Kim, J.J., Kong, B., and Wei, J.-J. (2014). Molecular analyses of 6 different types of uterine smooth muscle tumors: Emphasis in atypical leiomyoma. *Cancer* 120, 3165–3177.
- Zhang, S.Q., Tsiaras, W.G., Araki, T., Wen, G., Minichiello, L., Klein, R., and Neel, B.G. (2002). Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4062–4072.
- Zhang, X., Yang, H., Yue, S., He, G., Qu, S., Zhang, Z., Ma, B., Ding, R., Peng, W., Zhang, H., et al. (2017). The mTOR inhibition in concurrence with ERK1/2 activation is involved in

excessive autophagy induced by glycyrrhizin in hepatocellular carcinoma. *Cancer Med.* *6*, 1941–1951.

Zhu, Y., Tian, T., Zou, J., Wang, Q., Li, Z., Li, Y., Liu, X., Dong, B., Li, N., Gao, J., et al. (2015a). Dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 exerts extensive antitumor activity in HER2-positive gastric cancer. *BMC Cancer* *15*, 894.

Zhu, Y.-R., Min, H., Fang, J.-F., Zhou, F., Deng, X.-W., and Zhang, Y.-Q. (2015b). Activity of the novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 against osteosarcoma. *Cancer Biol. Ther.* *16*, 602–609.

Zimmermann, S., and Moelling, K. (1999). Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* *286*, 1741–1744.

Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* *144*, 757–768.