

Université des Sciences et Technologies de Lille
Institut de Biologie de Lille, CNRS UMR 8161
Ecole Doctorale Biologie-Santé

Thèse de doctorat

Préparée par

Frédéric ANCOT

En vue de l'obtention du grade de docteur d'université

Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Dégradation du récepteur tyrosine kinase Met par clivages protéolytiques

Soutenue le 28 octobre 2010

Devant le jury composé de :

Président :	Pr Hubert HONDERMARCK
Rapporteurs :	Dr Christel BROU
	Dr Servane TAUSZIG-DELAMASURE
Examineur :	Dr Stéphanie KERMORGANT
Directeur de Thèse :	Dr David TULASNE

*I found it hard, it's hard to find
Oh well, whatever, nevermind*

Kurt Cobain

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury qui ont accepté de juger mon travail. Merci aux Dr Christel Brou et Servane Tauszig-Delemasure d'avoir accepté d'être mes rapporteurs, au Pr Hubert Hondermarck de présider ce jury et au Dr Stéphanie Kermorgant d'être mon examinateur.

Je remercie Yvan de Launoit de m'avoir accueilli au sein de l'UMR8161 et de m'avoir soutenu lors de ma demande de quatrième année à l'Association pour la Recherche sur le Cancer ainsi que lors de ma recherche d'un laboratoire d'accueil pour mon post-doctorat.

Je remercie le ministère de la recherche et l'ARC pour m'avoir financé durant mes quatre années de thèse.

Je remercie tout particulièrement le Dr David Tulasne, mon « Master Chief », à l'optimisme inoxydable et à la curiosité insassiable. Tu es l'exemple vivant du chercheur passionné et entreprenant qui a su resté humain. Tu m'as toujours soutenu bien que je t'en aie fait voir de toutes les couleurs et je sais qu'une bonne partie de mes enseignements te devront beaucoup.

Je remercie également Catherine Leroy, une petite carapace de mauvaise humeur qui recouvre un cœur grand comme ça ! Une énergie incroyable au service du laboratoire et surtout une amie qui ne m'abandonnera jamais. Tu mérites plus que quiconque que tous tes rêves se réalisent...

Merci à Jonathan Lefebvre qui connaît aussi bien que moi les âpres désillusions de la recherche sur les fragments de Met. Courage ! Je suis sûr que tu trouveras ce que tu cherches (et non, je ne parle pas de ton timer).

Je remercie le Dr Ghaffar Muharram, notre post-doctorant préféré (oui, c'est le seul et alors ?!), pour son amitié et nos discussions sur les multiples hypothèses sur les multiples fragments de Met.

Je remercie tout particulièrement Arnaud Lemièrre, je n'oublie pas qu'avec un seul de tes résultats, tu m'as permis de lancer un tout nouvel axe de recherche avec un article à la clef.

Je remercie aussi les Dr Anne Chotteau-Lelièvre et Zoulika Kherrouche ainsi que Franck Ladam et Isabelle Damour, les nouveaux « Signaux », pour leur apport à notre équipe (et je parle pas que des facteurs de transcription !)

Je remercie également les membres de l'ex-équipe IECE : le groupe ICE qui n'a jamais rien lâché et qui s'en trouve aujourd'hui renforcé dans ses projets. Plus personnellement, je tiens à remercier Chantal Vercamer qui a longtemps été ma voisine de paillasse, dure au travail et tellement gentille (bon, faut pas toucher aux affaires des ICE sinon gare !) ainsi que le Dr Albin Pourtier, mon

tuteur pédagogique, qui m'a permis d'apprécier l'enseignement. Dans le groupe COSMIC, j'aimerais remercier le Dr Véronique Fafeur ainsi que tous les membres de son équipe à qui je souhaite le meilleur.

Merci à tous les membres de l'UMR 8161 pour ces 5 années passées en votre compagnie, je m'y suis toujours senti bien et m'ont permis de vivre sereinement les hauts et les bas qui ont jalonné ma thèse. Un petit coucou à Ingrid Loison et Nathalie Marchand, profitez bien de vos bouts de choux ! Et une dédicace spéciale au Dr Vanessa Dehennaut, au final, cela ne fait pas si longtemps que tu es arrivée à l'IBL mais tu es déjà devenu une grande amie. Beaucoup de bonheur pour ta petite famille !

Une pensée particulière à mes compgnons de galère, les « thésards », souvent peu considérés alors qu'ils sont le fer de lance de la recherche. Tout ce qu'ils ont c'est un CDD, des horaires souvent hallucinants et une motivation hors du commun, tout ça pour un espoir (un espoir de fou aurait dit Gandalf), l'espoir de faire de la recherche leur passion. Bonne chance à tous (on en aura besoin...).

Je remercie les anciens comme Cindy Degerny (qui arrive encore à m'aider malgré les kilomètres), Alessandro Furlan (spécialiste ès haribo), Sébastien Martien, Nicolas Stankovic, Capucine Fleuriel (tu sais que je te dois plus qu'une thèse), Johan Bacart, Pierre Wizla et Marion Le Jeune (ah, vous trois vous en aurez bien bavé !) ainsi que les plus (ou moins) jeunes Emeric Deruy, Nicolas Malaquin, Gaylord Boulay et Audrey Richard, des jeunes chercheurs qui m'ont bien fait rire tout au long de ces années. Un dernier salut à notre nouveau, Rémi Montagne, qui porte tous les espoirs des recherches sur les fragments de Met sur ces épaules, bonne chance et ne pense surtout pas aux 10 années nécessaires pour (peut-être) obtenir un porte de chercheur en France.

Je tiens à remercier ma famille qui me soutient toujours bien qu'ils ne sachent pas vraiment ce que je fais, une vraie bouffée d'oxygène qui m'empêche de me prendre trop au sérieux. Un grand merci également à ma belle-famille d'un soutien sans faille.

Et pour finir, merci à Bénédicte, tu es tout pour moi et je ne peux qu'essayer de te rendre une partie de tout ce que tu me donnes. Je ferai tout pour que tu sois fier de moi et parvenir à combler tes désirs quels qu'ils soient...

Et toi, Adam, mon grand petit bonhomme, tu pourras toujours avoir confiance en ton papounet qui t'aime !

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	4
RESUME	8
ABSTRACT	10
TABLE DES FIGURES	12
LISTE DES ABBREVIATIONS	15
INTRODUCTION	19
I- LES ORIGINES DE MET	20
A- Met, le récepteur tyrosine kinase	21
B- HGF/SF, le facteur de croissance	22
C- Une rencontre et beaucoup d'effets physiologiques	24
II- LES ROLES DU COUPLE HGF/SF-MET	25
A- De l'embryogenèse à la blessure	25
1) Patrons d'expression de Met et de l'HGF/SF	25
2) Fonctions du couple lors du développement	26
3) Toujours efficace chez l'adulte	29
B- Capable de toutes les réponses	30
III- LES SECRETS DE LEUR EFFICACITE	32
A- Les relations extracellulaires du couple	32
1) Les protéines extracellulaires	32
2) Les partenaires membranaires	33
a) Les intégrines, acteurs de l'adhérence	33
b) La E-cadhérine et les jonctions cellulaires	34
c) La Plexine B, un homologue à Met	34
d) Les isoformes de CD44	35
e) Association avec FAS et orientation vers l'apoptose	35
f) La décorine et LRIG induisent la dégradation de Met	36
B- Sous la surface...	36
1) Les cascades de signalisation	37
a) La voie des MAPkinases	37
b) La voie PI3Kinase/Akt	38
c) GAB1, au service de la signalisation	38
d) Les prédispositions des voies de signalisation	39
e) Les signalisations post-internalisation	40

2) La dégradation dépendante du ligand-----	40
a) L'internalisation -----	40
b) Transporté jusqu'au lysosome -----	42
IV- LE COUPLE HGF/SF-MET ET LE CANCER -----	42
A- HGF/SF et Met perdent le contrôle-----	43
1) Mutations-----	43
2) Surexpression-----	45
3) Activation paracrine ou autocrine de Met ?-----	47
B- Notion d'addiction à Met -----	49
C- Met et les membres de la famille des récepteurs à l'EGF-----	49
D- Met est une cible thérapeutique-----	50
1) Molécules antagonistes de l'HGF/SF et de Met -----	51
2) Anticorps bloquants -----	51
3) Inhibiteurs du domaine kinase -----	53
V- NOUVELLES FONCTIONS DE MET PAR CLIVAGES PROTEOLYTIQUES----	55
A- Fonctions connues des fragments de RTK -----	55
Publication 1 : Proteolytic cleavages give receptor tyrosine kinases the gift of ubiquity.55	
B- Clivages de Met par les caspases -----	56
1) L'apoptose -----	56
2) Survie induite par Met et l'HGF/SF-----	57
3) Le rôle pro-apoptotique de Met-----	57
4) Les récepteurs à dépendance -----	59
C- Elagage du récepteur Met-----	60
1) Caractéristiques de l'élagage-----	60
2) L'élagage libère le domaine extracellulaire de Met-----	61
RESULTATS-----	63
I- ROLES DU CLIVAGE C-TERMINAL DE MET PAR LES CASPASES -----	64
A- Contexte de l'étude -----	64
B- Résumé de la publication 2 et l'étude du clivage C-terminal de Met endogène -----	64
Publication 2 : Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the Met tyrosine kinase receptor.	66
C- Résultats complémentaires -----	67
1) Une étiquette GFP pour étudier le clivage C-terminal -----	67
2) Rôle de la forme écourtée du récepteur Met -----	70
a) Hypothèses de travail -----	70

b) Le clivage C-terminal ne modifie pas les réponses au ligand -----	72
D- Discussion-----	76
1) Séquentialité des clivages caspase de Met -----	76
2) Le clivage C-terminal convertit Met en récepteur à dépendance ? -----	77
II- DEGRADATION DE MET PAR LE PS-RIP-----	78
A- Contexte de l'étude -----	78
B- Résumé de l'étude et rôle du PS-RIP de Met -----	78
Publication 3 : Down-regulation of the Met receptor tyrosine kinase by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis	80
III- L'ELAGAGE N'INDUIT PAS UNE MAIS DEUX VOIES DE DEGRADATION DE MET-----	81
A- Contexte de l'étude -----	81
B- Résumé de l'étude : élagage et dégradation lysosomale de Met -----	81
Publication 4 : Shedding-generated Met receptor fragments can be routed to either the proteasomal or the lysosomal degradation pathway.	83
C- Résultats complémentaires sur la protéase responsable de l'élagage-----	84
D- Discussion-----	86
1) Régulation de l'élagage de Met-----	87
2) Comparaison de la voie PS-RIP et de la voie lysosomale -----	88
3) Les fragments de Met et le cancer-----	89
CONCLUSION -----	91
BIBLIOGRAPHIE-----	94
ANNEXES -----	118
Publication 5: Phosphorylation of the met receptor on juxtamembrane tyrosine residue 1001 inhibits its caspase-dependent cleavage.	
Valorisation des compétences: Le nouveau chapitre de la thèse	

RESUME

Le facteur de croissance HGF/SF (hepatocyte growth factor/scatter factor) est le ligand du récepteur membranaire Met de la famille des récepteurs tyrosine kinase. Le couple HGF/SF-Met joue un rôle essentiel lors du développement embryonnaire et la dérégulation de leur activité est associée à la progression tumorale et à la métastase dans de nombreux types de cancers.

Bien que le récepteur Met soit classiquement associé à la survie, en condition de stress et en absence de ligand, Met est clivé par des caspases dans le domaine juxta-membranaire et libère un fragment proapoptotique dans le cytoplasme, p40 Met. J'ai pu montrer qu'un clivage C-terminal de Met précède celui de la région juxtamembranaire créant une séquentialité dans les clivages. La forme écourtée du récepteur devient même majoritaire au cours du processus apoptotique. Le clivage C-terminal du récepteur Met est important dans la formation du fragment apoptotique mais n'affecte pas les réponses biologiques induites par l'HGF/SF.

D'autre part, Met est une cible de la « presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis » (ou PS-RIP). Ce processus de dégradation protéolytique implique un double clivage séquentiel par des métalloprotéases membranaires puis par le complexe γ -secrétase. Ces clivages régulent la demi-vie du récepteur Met et préviennent son activation en absence de ligand.

Suite au clivage par les métalloprotéases, Met peut également échapper au complexe γ -secrétase par son internalisation préalable. Les fragments générés sont alors dégradés par le lysosome. J'ai pu montrer que les fragments normalement éliminés par ces deux voies de dégradation ont la capacité de transformer des fibroblastes. De façon intéressante, l'analyse de xénogreffes de tumeurs humaines chez des souris a montré une accumulation de ces fragments. Nous proposons donc que les voies de dégradation PS-RIP et lysosomale préviennent l'accumulation de fragments délétères de Met.

Les différents clivages du récepteur Met permettent de réguler son action en absence d'HGF/SF. Que ce soit en condition apoptotique où ils favorisent la mort ou lorsqu'ils préviennent l'activation indépendante du ligand, les clivages influent sur les fonctions de Met et pourraient donc jouer un rôle important dans les réponses biologiques qu'il régule.

ABSTRACT

The HGF/SF, for Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor, is the ligand of the membrane receptor Met which belongs to the receptor tyrosine kinase family. HGF/SF-Met play an essential role during embryonic development and the dysregulation of their signaling is associated to tumoral growth and to metastasis in numerous cancers.

Although the Met receptor is classically associated to the survival, in stress condition and without its ligand, Met is cleaved by caspases in the juxtamembrane domain which liberates a proapoptotic fragment in cytoplasm, p40 Met. I have shown that a C-terminal cleavage of Met precedes the juxtamembrane one, creating a hierarchical organization of these cleavages. The shortened Met becomes even the main form of Met during the apoptotic process. The C-terminal cleavage of Met receptor is important to generate apoptotic fragment but does not affect the biological responses induced by the HGF/SF.

On the other hand, Met is targeted by PreSenilin-dependent Regulated Intramembrane Proteolysis (called PS-RIP). This proteolytic process of degradation involves two sequential cleavages by membranous metalloproteases and by γ -secretase complex. These cleavages regulate half-life of Met receptor and prevent its activation without ligand.

Following the cleavage by metalloproteases, Met can escape from γ -secretase complex through its prior internalization. Generated fragments are then degraded by the lysosome. I have shown the fragments normally eliminated by both degradation pathways are able to transform fibroblasts. Interestingly, human tumor xenografts in mice display accumulation of these fragments, suggesting these PS-RIP and lysosomal degradations pathways prevent accumulation of deleterious fragments of Met.

Different cleavages of Met receptor can regulate its action without HGF/SF. In apoptotic condition by promoting cellular death or by preventing ligand-independent activation, these cleavages can modify Met functions and could have an important role in biological responses implicating Met.

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Découverte de l'oncogène TPR-Met	20
Figure 2: Domaines et structures tridimensionnelles du récepteur Met.....	22
Figure 3: Domaines et structures tridimensionnelles de l'HGF/SF	23
Figure 4: Structures tridimensionnelles du complexe HGF/SF-Met.....	25
Figure 5 : Phénotypes des souris sauvage et KO HGF/SF ou Met -/-	27
Figure 6: Innervation des muscles de membres	28
Figure 7: Réponses biologiques du couple HGF/SF-Met	31
Figure 8: Interactions de Met à la membrane.....	33
Figure 9: Réponses biologiques associées aux protéines de signalisation du couple HGF/SF-Met	39
Figure 10: Dégradation du récepteur Met en présence d'HGF/SF.....	41
Figure 11: Mutations de Met identifiées chez l'Homme.....	44
Figure 12: Tableau des cancers impliquant HGF/SF et Met.....	48
Figure 13: Différents modes d'inhibition du couple HGF/SF-Met.....	50
Figure 14: Tableau des outils thérapeutiques inhibant Met en essais cliniques.....	54
Figure 15: Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.....	56
Figure 16: Fonctions de Met lors de l'apoptose	58
Figure 17: Mécanisme du PS-RIP	61
Figure 18: MDCK transfectées par les Trk-Met étiquetés par la GFP	67
Figure 19: Western-Blot des cellules MDCK exprimant les Trk-Met étiquetés par la GFP ...	68
Figure 20: Traitements apoptotiques des cellules exprimant les Trk-Met étiquetés par la GFP	70
Figure 21: Expressions membranaires des cellules Trk-Met _{WT} et Trk-Met écourté dans les cellules MDCK.....	72
Figure 22: Réponses de dispersion dans les cellules MDCK exprimant Trk-Met _{WT} et Trk-Met écourté	73

Figure 23: Réponses de morphogenèse dans les cellules MDCK	
exprimant Trk-Met _{WT} et Trk-Met écourté	74
Figure 24: Réponses de transformation de fibroblastes NIH-3T3	
exprimant Trk-Met _{WT} et Trk-Met écourté	75
Figure 25: Action des siRNA dirigés contre les ADAM7, 8 et 9 sur Met	
dans les cellules A549	84
Figure 26: Utilisation simultanée des siRNA dirigés contre les ADAM 9, 10, 12, 15 et 17	
sur Met dans les cellules A549	85
Figure 27: Schéma récapitulatif des voies de dégradation de Met en absence de ligand.....	86
Figure 28: Schéma récapitulatif des fonctions des fragments de Met.....	92

LISTE DES ABBREVIATIONS

aa : acides aminés
 ADN : Acide DésoxyriboNucléique
 ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase
 APAF-1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
 APP : Amyloid Precursor Protein
 ARNm : Acide RiboNucléique messenger
 ATP : Adénosine TriPhosphate
 BAD : Bcl-2-Associated Death promoter
 CAD : Caspase-Activated Desoxyribonuclease
 Caspase : CysteinyI ASPartate proteASE
 CBL : Casitas B-lineage Lymphoma
 cIAP : Inhibitor of APoptosis
 CIN-85 : Cbl-interacting protein of 85K
 CSFR : granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor
 DCC : Deleted in Colorectal Cancer
 DISC : Death-Inducing Signalling Complex
 DS : Dermatanes Sulfates
 EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
 ERM : Ezrin, Radixin et Moesin
 ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport
 FADD : FAS Associated protein with Death Domain
 FLICE : FADD-Like IL-1 β -Converting Enzyme
 FAK : Focal Adhesion Kinase
 FAS : Fibroblast ASSociated
 FBS : Fetal Bovine Serum
 FGF : Fibroblaste Growth Factor
 FGFR1 : Fibroblast Growth Factor Receptor 1
 FLIP : FLICE-Like Inhibitory Protein
 GAB1 : Grb2-Associated protein Binding 1
 GABA : Gamma-AminoButyric Acid
 GFP : Green Fluorescence Protein
 HB-EGF : Heparin-Binding EGF
 HGF-A : Activateur de l'HGF/SF
 HGF/SF : Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor
 HIF : Hypoxia Inducible Factors
 HOS : Human OsteoSarcoma
 HRS : Hepatocyte growth factor-Regulated tyrosine kinase Substrate
 HS : Héparanes Sulfates
 IAP : Inhibitor of APoptosis
 IL-1 β : InterLeukin-1 β
 ICAD : Inhibitor of Caspase-Activated Desoxyribonuclease
 ILV : Vésicule Intra-Luminale

IPT : Immunoglobulin-like region in Plexin and Transcription factors
 JNK : c-Jun N-terminal Kinase
 KI : Knock-In
 KO : Knock-Out
 LPA : LysoPhosphatidic Acid
 LRIG : Leucine-rich Repeats and ImmunoGlobulin-like domains
 MAPKinases : Mitogen-Activated Protein Kinase
 MBD : Met Binding Domain
 MCF7 : Michigan Cancer Foundation 7
 MDCK : Madin-Darby Canine Kidney cell
 MDM2 : Murin Double Minute 2
 miARN : micro Acide RiboNucléique
 MMP :Matrix MetalloProteinase
 Met-CTF : Met-C-Terminal Fragment
 Met-ICD : Met-IntraCellular Domain
 Met-NTF : Met-N-Terminal Fragment
 MNNG : n-Methyl-N'-Nitro-N-NitrosoGuanine
 MRS : Met Related Sequence
 MVE : Multi-Vesicular Endosome
 NGF : Nerve Growth Factor
 p75^{NTR} : p75 NeuroTrophin Receptor
 PDPK1 :3-PhosphoInositide Dependent Protein Kinase-1
 PDGFβR : Platelet-Derived Growth Factor β Receptor
 PGE2 : ProstaGlandine E2
 PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase
 PIP3 : PhosphatidylInositol (3,4,5)-Trisphosphate
 PKC : Protein Kinase C
 PLC : PhosphoLipase C
 PP2A : Protein Phosphatase 2A
 PSI : Plexin, Semaphorin, Integrin domain
 PS-RIP : PreSenilin-Regulated Intramembrane Proteolysis
 PTEN : Phosphatase and TENsin Homologue
 RasGAP : Ras GTPase Activating Protein
 Ras-GDP : Ras-Guanosine DiPhosphate
 Ras-GTP : Ras-Guanosine TriPhosphate
 RON : Récepteur d'Origine Nantais
 ROS : Reactive Oxigene Species
 RTK : Récepteur Tyrosine Kinase
 SEMA : SEMAphorin
 SH2 : Src Homology 2
 SHC : Src Homology 2 domain-Containing
 SHP2 : Src Homology 2-containing tyrosine Phosphatase
 siRNA : small interfering RiboNucleic Acid
 SLRP : Small Leucin-Rich Proteoglycan

SOS : Sons Of the Sevenless
STAT3 : Signal Transducers and Activator of Transcription 3
Tiam-1 : T lymphoma Invasion And Metastasis-1)
TNF : Tumor Necrosis Factor
TGF- α : Transforming Growth Factor- α
TP : Transition de Perméabilité
TPA : 2-O-TetradecanoylPhorbol-13-Acetate
TPR : Translocated Promoter Region
TRAF2 : TNF Receptor-Associated Factor 2
TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
UTR : UnTranslated Region
U.V. : Ultra-Violet
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
Z-VAD-fmk : N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me) fluoromethyl ketone

INTRODUCTION

I- Les origines de Met

En 1976, une équipe a étudié l'action d'un virus lié aux sarcomes du poulet qui modifie le génome des cellules infectées en y introduisant le gène *src* (Rous sarcoma oncogene cellular homolog). La transfection de la séquence du gène *src* dans des fibroblastes normaux a permis à ces cellules d'acquérir des propriétés transformantes, et ainsi a été découvert le premier oncogène (Stehelin et al., 1976). Fin des années 70, d'autres oncogènes sont découverts en modifiant le génome de cellules par infections virales, par radiation ou par l'action de produits chimiques carcinogènes tels que le N-Methyl-N'-Nitro-N-NitrosoGuanine (MNNG). Les cellules HOS (Human OsteoSarcoma) acquièrent un phénotype transformant en présence de MNNG (Rhim et al., 1975). Afin d'identifier le ou les oncogènes responsables, l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) humain de ces cellules est transfecté dans des NIH-3T3, des fibroblastes murins, et les cellules transformées sont récupérées. Grâce à une sonde spécifique à l'ADN humain, l'oncogène capable de transformer les cellules murines a été identifié (voir Figure 1) (Cooper et al., 1984).

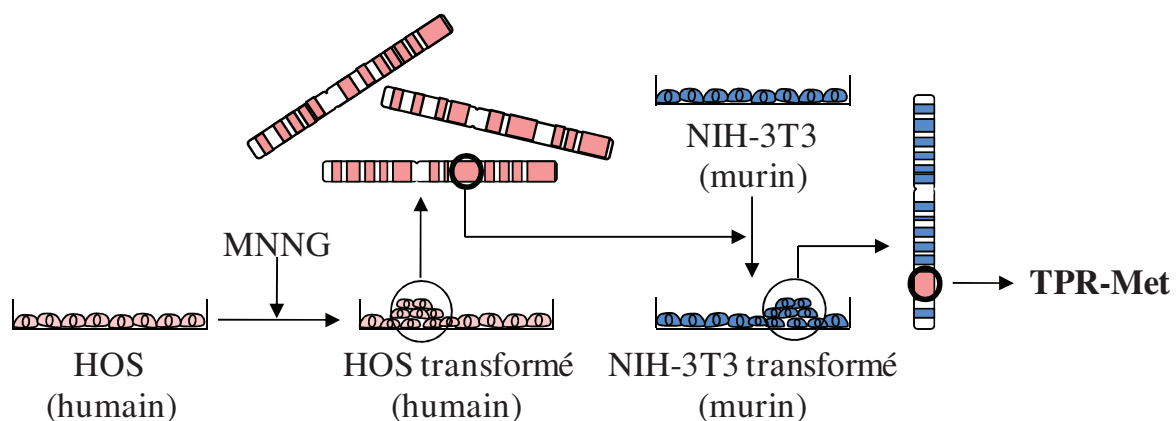


Figure 1: Découverte de l'oncogène TPR-Met

Les cellules HOS sont traitées par l'agent carcinogène chimique MNNG. L'ADN des cellules transformées est transfecté dans les cellules NIH-3T3. Le gène transformant est identifié dans l'ADN murin des NIH-3T3 grâce à une sonde spécifique de l'ADN humain (Cooper et al., 1984).

Cet oncogène, jusqu'alors inconnu résulte d'un réarrangement chromosomique entre un premier fragment de 10 kb du chromosome 1 et un second fragment de 9 kb du chromosome 7 (Park et al., 1986). Le premier s'est révélé être une séquence codant un domaine de dimérisation d'une protéine du nucléopore appelée TPR (Translocated Promoter Region)

(Rodrigues and Park, 1993). Le second fragment possède une forte homologie avec le domaine intracellulaire des récepteurs tyrosine kinase (RTK), Il s'agit en fait de la partie intracellulaire d'un nouveau récepteur de la famille des RTK (Park et al., 1987). Il est baptisé Met car il a été identifié dans des cellules HOS transformées par l'action du N-Méthyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine. Le domaine TPR induit une forte dimérisation et l'activation du domaine kinase de Met; la protéine chimérique TPR-Met est donc constitutivement active et de ce fait, transformante.

A- Met, le récepteur tyrosine kinase

Le gène *met* se situe sur la bande 7q21-q31 du chromosome 7. Il comprend 120 kb répartis sur 21 exons et 20 introns, son transcrit principal est de 8 kb (Lin et al., 1998). L'ARNm (Acide RiboNucléique messenger) de *met* est traduit sous la forme d'un précurseur de 150 kDa. Lors de son transport jusqu'à la membrane, le futur domaine extracellulaire de Met est N-glycosylé et la masse de la protéine est alors de 170 kDa. Pour achever le cycle de maturation du récepteur, Met subit un clivage entre la lysine 307 et l'arginine 308. Il a été montré que la protéase impliquée est la furine dont le site consensus est Arg-X-Arg/Lys-Arg (Komada et al., 1993). L'hétérodimère est alors composé de deux sous-unités de 50 et de 145 kDa, nommées respectivement α et β , reliées par des ponts disulfures (Tempest et al., 1988).

La sous-unité α est exclusivement extracellulaire tandis que la sous-unité β comprend 3 parties : un domaine extracellulaire interagissant avec la sous-unité α et deux parties respectivement transmembranaire et intracellulaire (voir Figure 2). Les 500 premiers acides aminés (aa) correspondent à un domaine caractéristique de la semaphorine, le domaine SEMA. Celui-ci comprend la sous-unité α et la partie N-terminale de la sous-unité β (Kolodkin et al., 1993), il est structuré en 7 pales disposées en hélice comprenant chacune 4 feuillets β antiparallèles (Stamos et al., 2004). Après le domaine SEMA se trouve une séquence riche en cystéines connue sous le nom de MRS (« Met Related Sequence ») ou de PSI (car les Plexines, les Sémaforines et les Intégrines partagent cette homologie de séquence). Succèdent ensuite 4 domaines homologues des immunoglobulines G nommés domaines IPT (« Immunoglobulin-like region in Plexin and Transcription factors ») numérotés de 1 à 4 (Benvenuti and Comoglio, 2007). La partie extracellulaire du récepteur Met est clairement asymétrique avec un domaine SEMA globulaire surmontant une structure linéaire composée du domaine PSI et des domaines IPT. Le domaine faisant le lien entre les domaines extracellulaire et intracellulaire de Met est une unique séquence transmembranaire.

La partie intracellulaire est principalement constituée d'un domaine kinase bilobé avec une partie N-terminale constituée de feuillets β qui s'articulent sur une partie C-terminale composée d'hélices α (Cristiani et al., 2005; Wang et al., 2006).

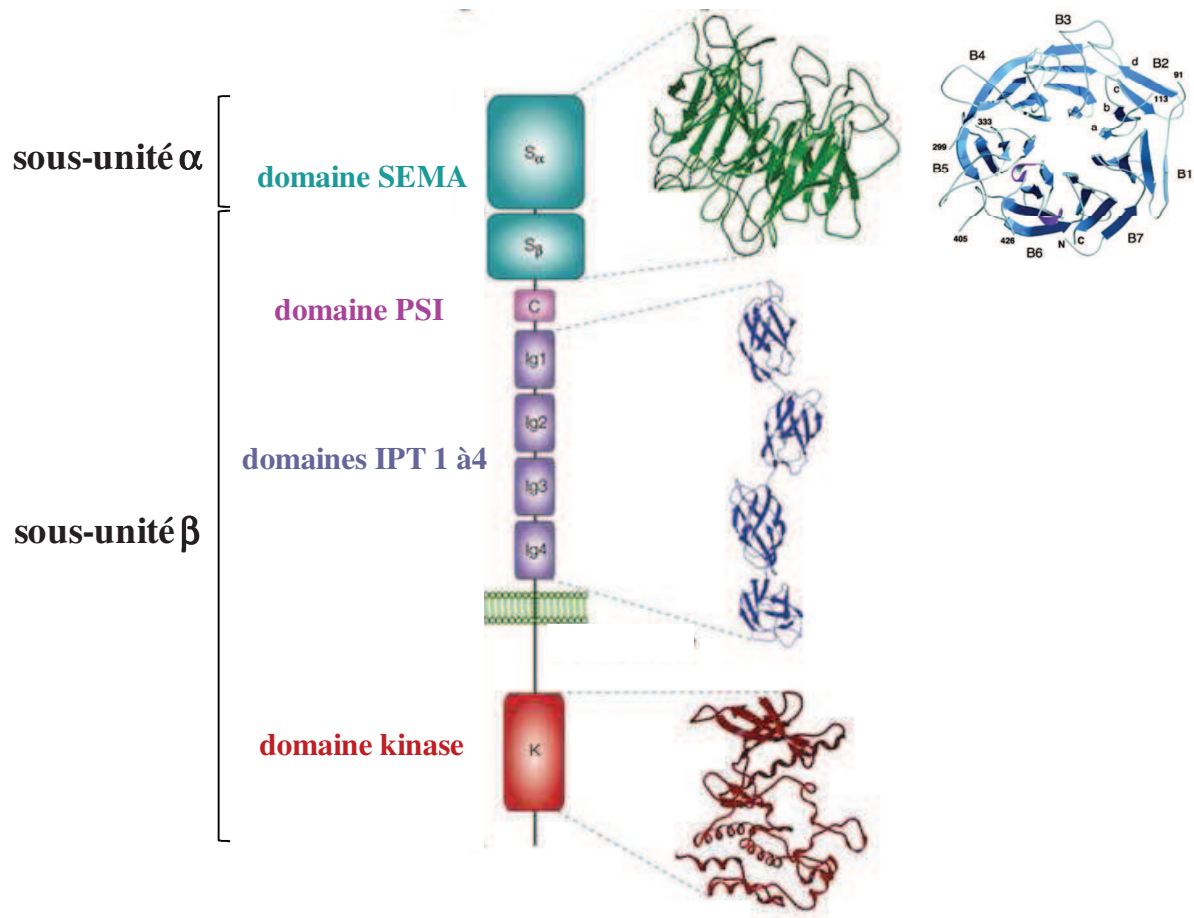


Figure 2: Domaines et structures tridimensionnelles du récepteur Met
(Tiré de (Birchmeier et al., 2003))

B- HGF/SF, le facteur de croissance

L'année de la découverte de la chimère TPR-Met, une protéine présente dans une fraction purifiée de serum de rats partiellement hépatectomisés permet d'augmenter la prolifération d'hépatocytes en culture. Ce nouveau facteur de croissance est appelé hépatotropine ou « Hepatocyte Growth Factor » (HGF) (Nakamura et al., 1984). Dans le même temps, le « scatter factor » (SF), présent dans une fraction d'un milieu conditionné par des fibroblastes, permet de rompre les jonctions des cellules épithéliales qui acquièrent alors des capacités de migration et de dispersion (Stoker et al., 1987). Les études menées sur ces deux protéines ont montré une importante homologie (Naldini et al., 1991b). Toutes deux sont des hétérodimères issus du clivage de leur précurseur (Miyazawa et al., 1993; Nakamura,

1991). De plus, les réponses biologiques qu'elles sont capables d'induire *in vitro* (prolifération, motilité ou invasion) sont semblables. Au final, il s'avère que les ADN complémentaires de l'HGF et du SF sont rigoureusement identiques (Naldini et al., 1991b) et le facteur de croissance sera alors définitivement nommé HGF/SF.

Le gène *hgf/sf* est situé sur la bande q21.1 du chromosome 7, il est constitué de 18 exons et de 17 introns (Seki et al., 1991). Son précurseur est N-glycosylé avant d'être sécrété sous la forme d'un précurseur inactif, le pro-HGF/SF. Tout comme le plasminogène, un homologue d'origine hépatique, l'activation de l'HGF/SF nécessite un clivage et différentes protéases peuvent en être responsables : la matriptase, l'activateur de l'HGF (HGF-A), l'hepsine et le facteur XIIA (Owen et al.). Le facteur de croissance devient alors un hétérodimère composé de deux sous-unités reliées par des ponts disulfures (voir Figure 3). La sous-unité α est composée d'un domaine N-terminal suivi de quatre domaines kringle. La sous-unité β est constituée d'un domaine homologue au sérine protéase n'ayant pas d'activité enzymatique (Holmes et al., 2007).

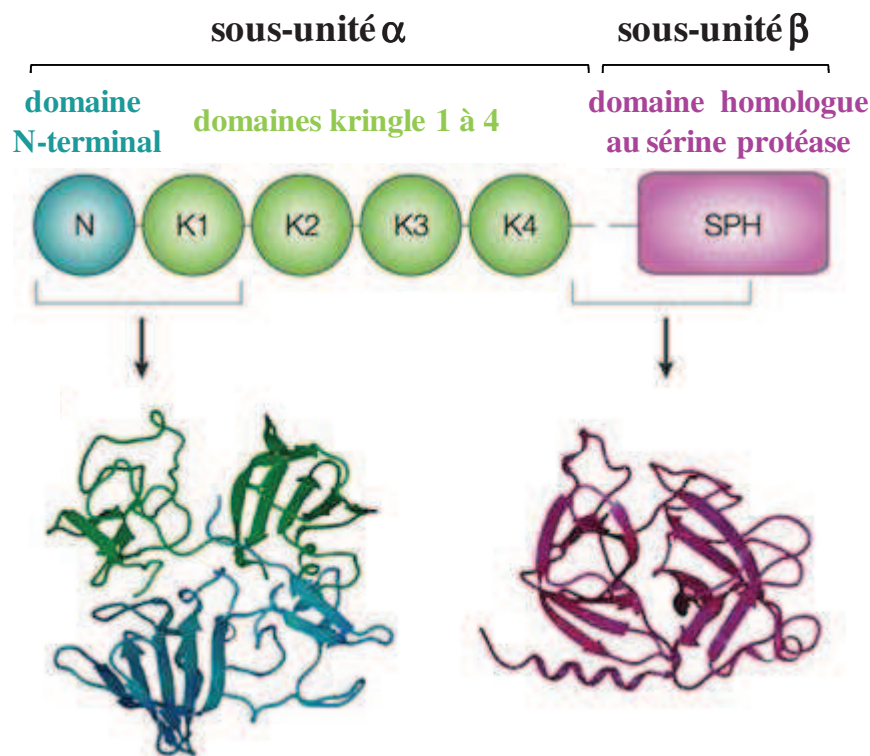


Figure 3: Domaines et structures tridimensionnelles de l'HGF/SF

Tiré de (Birchmeier et al., 2003))

C- Une rencontre et beaucoup d'effets physiologiques

L'HGF/SF reste orphelin pendant 7 ans avant que son récepteur ne soit identifié. En 1991, des cellules épithéliales ont été traitées par l'HGF/SF et une protéine de 145 kDa est immunoprécipitée par un anticorps reconnaissant des tyrosines phosphorylées. La taille de cette protéine et sa phosphorylation sur des résidus tyrosines ne semblaient laisser que peu de doutes quant à son identité. Pour s'en assurer, un anticorps spécifique a été utilisé et a enfin mis en évidence l'HGF/SF comme étant le ligand du récepteur tyrosine kinase Met (Bottaro et al., 1991). De nombreuses études ont alors été menées pour caractériser l'interaction de ces deux protéines.

La sous-unité β de l'HGF/SF reconnaît une zone située entre les pales 2 et 3 du domaine SEMA avec une faible affinité (constante de dissociation (K_d) : 90 nM) (Stamos et al., 2004). Quant à la sous-unité α , elle permet une interaction de forte affinité avec les domaines IPT 3 et 4 (Basilico et al., 2008). La forme pro-HGF, tout comme la sous-unité α , possède une forte affinité (K_d : 0.2-0.3 nM) pour Met mais ne le phosphophoryle pas (Lokker et al., 1992). En revanche, la sous-unité β permet la phosphorylation de Met malgré leur faible affinité (Kirchhofer et al., 2004). De manière intéressante, aucune de ces trois formes n'induit de réponse biologique. Seul l'HGF/SF mature, permettant à la fois d'interagir avec le domaine PSI et le domaine SEMA, est capable d'activer le récepteur et d'induire des réponses biologiques (Matsumoto et al., 1998). La double interaction du ligand avec des domaines PSI et SEMA pourrait être liée au rôle physiologique du pro-HGF/SF et de l'HGF/SF. Il a été proposé que le pro-HGF puisse interagir avec le récepteur sans l'activer afin d'être proche du lieu d'action de Met. En cas de nécessité, les protéases capables de cliver le pro-HGF/SF pourraient être aussitôt relarguées et l'HGF/SF alors mûr activerait rapidement le récepteur Met (Basilico et al., 2008).

Il a également été démontré qu'un complexe de deux récepteurs Met couplés à deux molécules d'HGF/SF se forment *via* une interaction entre les domaines N-terminaux et kringle 1 des deux molécules de ligand (Gherardi et al., 2006) (voir Figure 4). Le complexe formé permet alors aux deux domaines kinase de Met de s'autophosphoryler sur les tyrosines 1234 et 1235 localisées dans la boucle d'activation du domaine kinase (Ferracini et al., 1991; Longati et al., 1994; Naldini et al., 1991a). La phosphorylation de ces deux résidus stimule l'activité kinase intrinsèque du récepteur et permet la phosphorylation d'autres tyrosines notamment les résidus tyrosines 1349 et 1356. Situés dans l'extrémité C-terminale du

récepteur, ces deux acides aminés recrutent les protéines capables d'initier les voies de signalisation (Ponzetto et al., 1994).

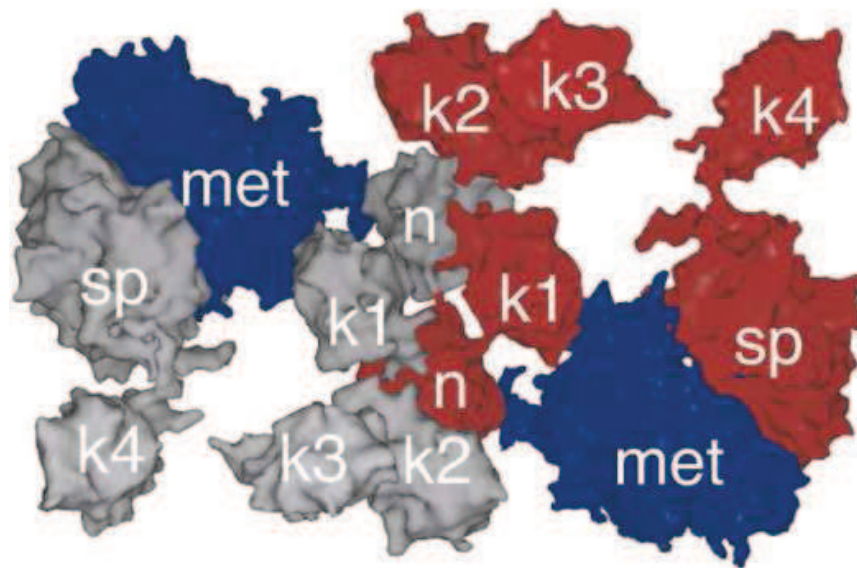


Figure 4: Structures tridimensionnelles du complexe HGF/SF-Met

Modélisation de l'interaction entre l'HGF/SF et les domaines SEMA de Met. sp : domaine d'homologie à la sérine protéase, k : domaine kringle, n : domaine N-terminal (Tiré de (Gherardi, 2006))

II- Les rôles du couple HGF/SF-Met

A- De l'embryogenèse à la blessure

Le couple Met-HGF/SF établit un dialogue entre les cellules mésenchymateuses et les cellules épithéliales. De nombreuses études ont été menées afin de décrypter leur fonction, notamment chez la souris. L'expression complémentaire du récepteur et de son ligand se révèle indispensable lors de l'embryogenèse et facilite la régénération de nombreux organes chez l'adulte.

1) Patrons d'expression de Met et de l'HGF/SF

Passée la phase de segmentation qui a vu l'œuf unique se diviser en milliers de cellules, l'embryon de souris devient une blastula. Durant cette phase précoce du développement, le récepteur Met et son ligand l'HGF/SF s'expriment conjointement dans l'endoderme et dans une partie de la ligne primitive du mésoderme. Lors de la gastrulation, où les feuillets endodermique, mésodermique et ectodermique se mettent en place, cette expression conjointe

perdure dans la corde et la neutocorde issues du mésoderme cordal. Il a été proposé que la régulation autocrine de l'HGF/SF sur Met participe aux déplacements des cellules mésodermiques lors de la gastrulation et de la mise en place de l'axe antéro-postérieur. Au cours de l'organogenèse, leur expression simultanée n'a lieu que dans le cœur, les somites et les cellules des crêtes neurales avant de s'arrêter définitivement à la moitié du développement (Andermarcher et al., 1996). Ce patron d'expression est remplacé progressivement par l'expression de Met dans les tissus épithéliaux et par l'expression de l'HGF/SF dans des tissus mésenchymateux. Au cours du développement, le récepteur est souvent présent à proximité de son ligand comme dans les arcs branchiaux et dans les bourgeons de membres. Cette expression complémentaire est retrouvée dans les somites différenciés et dans différents organes (poumons, foie, reins, intestin). L'expression de Met et de l'HGF/SF dans des tissus très proches suggère une régulation paracrine du ligand sur le récepteur (Andermarcher et al., 1996; Wilhelmsen et al., 2006).

Une étude similaire a été menée lors du développement du zebrafish (*danio rerio*), un petit poisson transparent idéal pour l'observation de l'embryogenèse. Dans les phases précoces du développement, Met est exprimé dans l'endoderme alors que ce n'est pas le cas de l'HGF/SF, ce qui peut suggérer que l'action du récepteur est indépendante du ligand dans ce contexte. Par la suite, leur patron d'expression est très similaire à celui observé chez la souris lors de la gastrulation puis dans le foie, les reins et les motoneurons lors de l'organogenèse (Latimer and Jessen, 2008). La similarité de patron d'expression de Met et de l'HGF/SF entre ces deux organismes suggère un rôle bien conservé au cours de l'évolution (Birchmeier and Gherardi, 1998).

2) Fonctions du couple lors du développement

Afin de déterminer le niveau d'implication de Met et de l'HGF/SF dans le développement, des KO (Knock Out) de *met* et de *hgf/sf* ont été réalisés chez des souris. L'absence de *hgf/sf* ou de *met* est létale dès le 15^{ème} jour de développement avec des phénotypes tout-à-fait similaires, confirmant le lien fonctionnel entre le récepteur et son ligand. En absence de Met ou d'HGF/SF, le réseau de tissu épithélial labyrinthique du trophoblaste est mal organisé et les échanges materno-fœtaux deviennent insuffisants. Le défaut d'approvisionnement en oxygène et en nutriments aboutit à la mort des embryons (Birchmeier and Gherardi, 1998; Uehara and Kitamura, 1996) (voir Figure 5).

Il a également été observé une diminution de la taille de l'embryon (voir Figure 5A). Le foie, notamment, est beaucoup moins développé, la perte de l'action prolifératrice de l'HGF/SF explique ce déficit en cellule hépatiques (voir Figure 5B) (Schmidt et al., 1995). En parallèle, l'absence de Met ou de son ligand empêche la formation des muscles des membres, du diaphragme et de la pointe de la langue. En effet, l'HGF/SF est exprimé dans les bourgeons de membres tandis que Met est présent dans les précurseurs myoblastiques du dermomyotome, une subdivision de la partie dorsale des somites (voir Figure 5C). L'action chemoattractive du ligand permet aux myoblastes exprimant le récepteur de migrer jusqu'aux membres et de proliférer afin de former les muscles (Bladt et al., 1995).

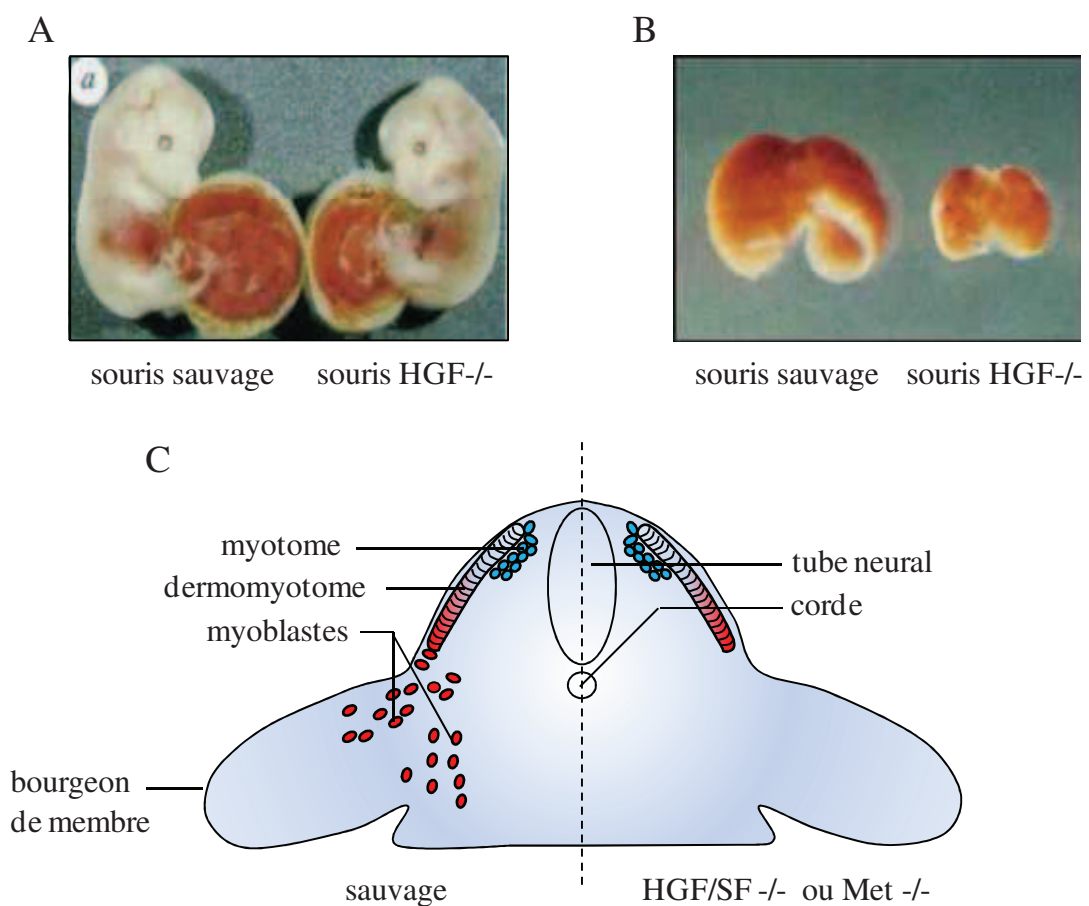


Figure 5 : Phénotypes des souris sauvage et KO HGF/SF ou Met ^{-/-}

A- Apparences externes d'embryons de souris sauvage et KO HGF/SF à 13,5 j de développement, (tiré de (Uehara et al., 1995)). B- Foies d'embryons de souris à 14,5 j de développement (tiré de (Schmidt et al., 1995)). C- Schéma de la migration des myoblastes vers les bourgeons de membres (d'après (Birchmeier et al., 2003)).

Au niveau de la tête, il a été montré plus tardivement le rôle du couple HGF/SF-Met dans la mise en place de certains muscles faciaux (Prunotto et al., 2004) et de l'angiogenèse rétinienne (Colombo et al., 2007), respectivement avec un KO conditionnel et l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre Met. Il a également été observé que le récepteur est exprimé dans les condyles mandibulaires (Leonardi et al., 2009) et les germes dentaires (Loreto et al., 2009) d'embryons humains sans toutefois connaître son rôle exact.

Le couple HGF/SF-Met agit également sur les cellules neuronales. Des KI (Knock-In) de Met dépourvu d'activité kinase prouvent que les deux acteurs sont indispensables pour l'innervation sensorielle des muscles de membres et que l'HGF/SF augmente la survie des motoneurones *in vitro* (Maina and Klein, 1999) (voir Figure 6). Dans le développement du cerveau, le KO inductible du récepteur empêche la migration de neurones dépendants de GABA (Gamma-AminoButyric Acid) dans l'hippocampe (Martins et al., 2007). De plus, une faible expression de Met dans certaines parties du cerveau serait corrélée à des troubles comme l'autisme ou la schizophrénie (Judson et al., 2009).

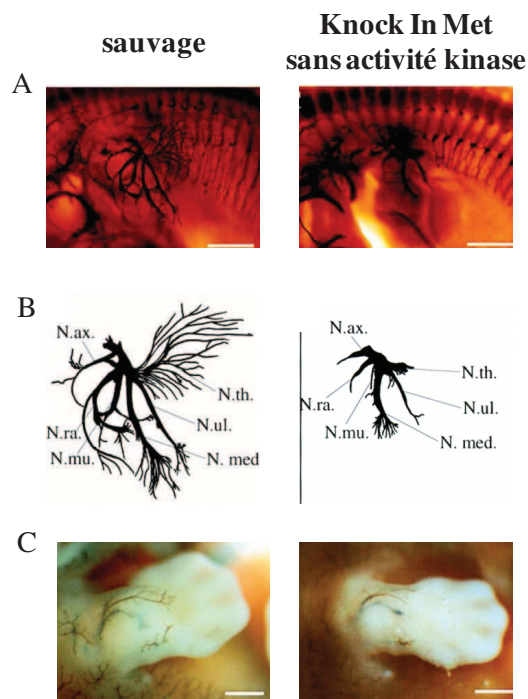


Figure 6: Innervation des muscles de membres

Comparaison de souris sauvages et de souris Knock In Met sans activité kinase à 12,5 jours de développement. A- Marquage des neurofilaments sur les tissus entiers du membre antérieur gauche et du thorax. B- Schéma des nerfs du membre antérieur (à noter la réduction importante des extrémités nerveuses). C- Marquage superficiel des neurofilaments du membre antérieur gauche (Tiré de (Maina et al., 1997)).

Bien que Met et l'HGF/SF aient été détectés dans le rein, leur KO n'a pas montré de défaut particulier dans cet organe au moment de la mort de l'embryon. Néanmoins, le KO conditionnel de Met dans le rein montre une diminution de bourgeons urétéraux qui deviendront les néphrons. Dans le même temps, l'expression de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) augmente ce qui suggère un mécanisme de compensation. Ainsi, l'extinction simultanée de ces deux récepteurs induit une diminution importante du nombre de néphrons conduisant à une insuffisance rénale menant à la mort un mois après la naissance des souriceaux. Ces résultats soulignent l'importance de la collaboration des deux récepteurs dans l'organogenèse du rein (Ishibe et al., 2009).

3) Toujours efficace chez l'adulte

Chez l'adulte, le couple HGF/SF-Met possède un rôle prépondérant dans la régénération de nombreux organes. En effet, les lésions ou ablations de certains organes, comme le foie, déclenchent un relargage rapide d'HGF/SF. Le taux d'HGF/SF augmente durant les premières heures puis diminue tout en restant plus élevé que la normale pendant plusieurs semaines. Le rôle du couple HGF/SF-Met dans la régénération des organes a notamment été confirmé par le KO conditionnel inductible de Met dans le foie de souris. Ainsi, après une hépatectomie ou des lésions hépatiques, l'extinction de Met provoque un délai de régénération plus long et une inflammation chronique au niveau des zones lésées (voir pour revue (Huh et al., 2004)). De plus, l'absence de Met diminue fortement les capacités de prolifération des hépatocytes (Borowiak et al., 2004; Huh et al., 2004; Phaneuf et al., 2004). Le couple HGF/SF-Met est tout aussi important pour la régénération de la peau. Après une blessure cutanée, le taux d'HGF/SF augmente et permet aux cellules exprimant Met de migrer et de proliférer. Le KO conditionnel du récepteur dans l'épiderme inhibe la cicatrisation et confirme les capacités régénératrices de Met et de son ligand (Chmielowiec et al., 2007).

L'augmentation du taux d'HGF/SF est également observée après l'infarctus du myocarde (Jin et al., 2003; Nakamura et al., 2000), les blessures pulmonaires (Ohmichi et al., 1996), la section de la moëlle épinière (Shimamura et al., 2007) et la néphrectomie ou les lésions rénales (Kawaida et al., 1994; Mizuno et al., 2008; Rabkin et al., 2001), ce qui suggère l'implication du couple HGF/SF-Met dans la régénération de ces organes. Ainsi, des injections d'HGF/SF ont permis d'améliorer la régénération du myocarde, des poumons et des reins (Jin et al., 2003; Kawaida et al., 1994; Mizuno et al., 2008; Nakamura et al., 2000; Ohmichi et al., 1996). L'action réparatrice du couple HGF/SF-Met ouvre également une

nouvelle piste quant au traitement des cirrhoses hépatiques. En effet, cette maladie chronique détruit les hépatocytes et l'injection d'HGF/SF pourrait contrer ce déficit en augmentant la prolifération de ces cellules (Mizuno and Nakamura, 2007). Grâce à ses capacités régénératrices, l'HGF/SF pourrait devenir un outil thérapeutique pluripotent capable d'améliorer la vie de nombreux malades.

Pour finir, l'HGF/SF et Met sont exprimés lors du développement de la glande mammaire chez la femme adulte. Les transcrits du couple diminuent durant la grossesse jusqu'à ne plus être détectés lors de la lactation puis augmentent à nouveau lors de l'involution, ce qui suggère que l'HGF/SF soit un régulateur de la morphogenèse de la glande mammaire (Soriano et al., 1998). Le couple est également exprimé dans les gonades mâles et femelles et serait impliqué dans de nombreux processus : croissance et différenciation des follicules ovariens, sécrétions d'hormones ainsi que la prolifération et la survie des cellules des organes reproducteurs (Zachow and Uzumcu, 2007). Les principaux outils utilisés sont l'injection d'HGF/SF dans les gonades femelles et l'utilisation de cellules primaires pour les études de signalisation. Cependant, des KO conditionnels permettraient d'affiner ces recherches comme le fait remarquer Zachow dans sa revue sur les appareils reproducteurs (Zachow and Uzumcu, 2007).

B- Capable de toutes les réponses

En accord avec ses nombreuses réponses biologiques *in vivo*, le couple HGF/SF-Met est capable d'induire de nombreuses réponses biologiques *in vitro* sur des cultures cellulaires (voir Figure 7). Les premières observations réalisées en utilisant le ligand ont montré une augmentation de la prolifération des cellules hépatiques (Nakamura et al., 1984) et de manière plus générale, une augmentation de la prolifération dans les cellules épithéliales (Maulik et al., 2002). Les capacités migratoires ont été également rapidement mises en évidence car le « Scatter Factor » permet la dispersion des cellules épithéliales (Stoker et al., 1987). Depuis la découverte de cette fonction dès 1987, il a été montré que l'HGF/SF est capable d'induire la motilité d'un grand nombre de cellules (Maulik et al., 2002). Le ligand permet aussi la mise en place d'une réponse biologique plus complexe : la morphogenèse (Montesano et al., 1991). Pour autant, cette réponse dépend des cellules utilisées, celles-ci doivent être capables de croître dans des gélases comprenant des composants de la matrice extracellulaire, de se structurer et de constituer des réseaux. Les cellules répondant à ces critères reconstituent *in vitro* des structures proches de leur tissu d'origine (Schmidt et al., 1995).

L'HGF/SF permet de stimuler l'angiogenèse, et ce, à différents niveaux. Tout d'abord, le ligand induit l'expression des métalloprotéases capables de dégrader la matrice extracellulaire, étape indispensable au développement de nouveaux vaisseaux. En parallèle, Met est exprimé dans les cellules endothéliales et la présence d'HGF/SF entraîne de nombreuses réponses biologiques : la prolifération, la survie, la migration et même la formation de tubules. L'observation de ces phénomènes démontre que le couple HGF/SF-Met est capable d'agir à toutes les étapes de l'angiogenèse. L'action du ligand passe également par l'augmentation de l'expression d'agents angiogènes comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et il a ainsi été observé une action synergique de ces deux facteurs de croissance sur l'angiogenèse (Abounader and Laterra, 2005; Bussolino et al., 1992).

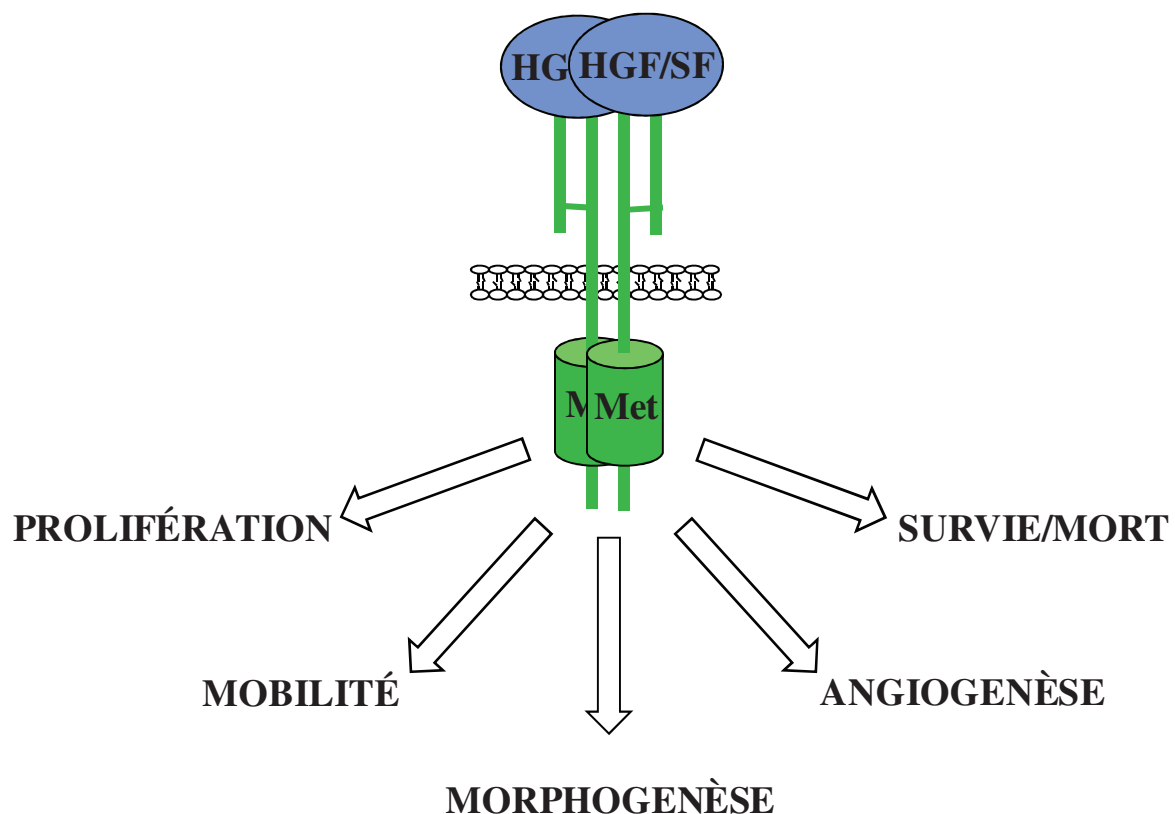


Figure 7: Réponses biologiques du couple HGF/SF-Met

Le couple HGF/SF-Met permet aussi aux cellules de survivre dans de nombreuses conditions de stress. Que ce soit en déplétion de serum ou en présence d'inducteurs de mort, l'activation du récepteur permet une meilleure survie d'un grand nombre de types cellulaires. A l'inverse, différentes études ont mis en évidence une action pro-apoptotique du ligand. Ainsi, il a été proposé que l'HGF/SF diminue les fibroses pulmonaires et hépatiques en

induisant la mort des cellules sécrétant l'exsudat responsable de ces nécroses, suggérant que les capacités apoptotiques du couple HGF/SF-Met ont un rôle physiologique (voir pour revue (Tulasne and Foveau, 2008)).

III- Les secrets de leur efficacité

L'action du couple HGF/SF-Met n'est pas unique, elle varie selon le type cellulaire ou le contexte. Afin de moduler finement ses différentes fonctions, le couple interagit directement avec un grand nombre d'acteurs : des protéines du milieu extracellulaire permettent de faciliter l'activation de Met par l'HGF/SF, des partenaires membranaires vont s'associer au récepteur et/ou au ligand pour moduler leur action et des protéines intracellulaires vont être recrutées afin d'initier les différentes voies de signalisation. Les multiples combinaisons de ces acteurs aboutiront alors à une ou à plusieurs réponses biologiques spécifiques.

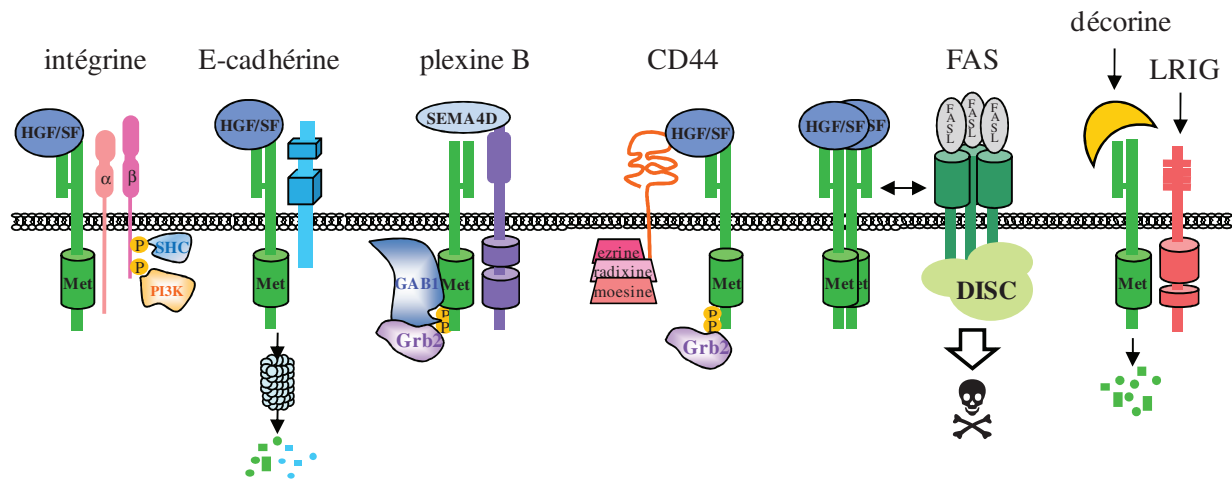
A- Les relations extracellulaires du couple

1) Les protéines extracellulaires

L'HGF/SF, sécrété sous sa forme immature, est reconnu par Met mais également par des glycoprotéines sulfatées telles l'héparine (Sakata et al., 1997), les héparanes sulfates (HS) (Lyon et al., 1994) et les dermatanes sulfates (DS) (Lyon et al., 1998). Comme les HS et les DS font partie des composants de la matrice extracellulaire, cela explique qu'un grand nombre de cellules présente une affinité pour l'HGF/SF (Ide et al., 2006). L'affinité de ces protéoglycanes sulfatés avec l'HGF/SF permet de capter le ligand, de favoriser son oligomérisation et ainsi de faciliter l'activation du récepteur Met (Kemp et al., 2006).

L'HGF/SF interagit aussi avec la nucléoline, une protéine essentiellement nucléaire mais présente également à la surface membranaire. La nucléoline est connue pour permettre l'endocytose d'autres facteurs de croissance et joue un rôle dans la tumorigenèse et l'angiogenèse (Tate et al., 2006). En l'absence de Met, l'HGF/SF et la nucléoline sont capables d'augmenter les capacités migratrices de cellules prostatiques suggérant un rôle original de la nucléoline dans une action de l'HGF/SF indépendamment de son récepteur.

2) Les partenaires membranaires

**Figure 8: Interactions de Met à la membrane**

(D'après (Lai et al., 2009))

a) Les intégrines, acteurs de l'adhérence

Les intégrines sont des protéoglycanes ancrés à la membrane plasmique. Chaque intégrine est composée de deux sous-unités α et β possédant de nombreuses isoformes. Ces hétérodimères sont essentiels aux interactions cellule-matrice et cellule-cellule.

Ainsi, l'intégrine $\alpha6\beta4$ permet la formation d'hémidesmosomes, des complexes membranaires responsables de l'adhésion entre les cellules. Met est capable d'interagir directement avec l'intégrine. De plus, la stimulation par l'HGF/SF induit la phosphorylation du récepteur et de l' $\alpha6\beta4$. La phosphorylation de l'intégrine prévient d'une part la formation d'hémidesmosomes et permet d'autre part le recrutement de la PI3Kinase (Phosphatidylinositol 3 Kinase) et de SHC (Src Homology 2 domain-Containing). L'induction de ces deux voies de signalisation aboutit alors à une réponse de migration. L'activation de Met par l'HGF/SF permet donc de convertir les capacités d'adhésion de l'intégrine $\alpha6\beta4$ en plateforme de signalisation capable de favoriser la migration (Trusolino et al., 2001; Wilhelmsen et al., 2006).

Récemment, il a également été montré que l'intégrine $\alpha3\beta1$ est capable d'interagir avec Met. Leur association permet à chacun de recruter les protéines de signalisation GAB1 (Grb2 Associated Binding 1) et PI3Kinase. Lors d'une étude sur l'intégrine $\alpha3\beta1$ et Met chez la souris, des explants de papilles rénales, où se déversent normalement les tubules collecteurs des reins, ont été prélevés et maintenus en culture organotypique. En présence d'HGF/SF, les

explants de souris sauvages survivent mieux que les explants de souris KO de l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$. Or, les anticorps bloquant l'HGF/SF diminuent la survie des explants de souris sauvages alors qu'ils n'ont aucun effet sur les explants issus de KO de l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$. Il a donc été proposé que les intégrines $\alpha 3 \beta 1$ et Met collaborent dans une réponse de survie des papilles rénales (Liu et al., 2009).

Met est donc capable de s'associer directement avec certaines intégrines et d'induire des réponses de signalisation (voir Figure 8). Cependant, l'action des intégrines sur Met peut également être indirecte, leur présence à la membrane augmente l'adhésion cellulaire qui permet alors la phosphorylation indépendante du récepteur dans certaines lignées cellulaires (Wang et al., 1996).

b) La E-cadhérine et les jonctions cellulaires

La E-cadhérine est nécessaire aux jonctions des cellules entre elles, notamment *via* la β -caténine, qui la relie au cytosquelette. La présence de la E-cadhérine est particulièrement importante au niveau des points focaux, les sites où les cellules se rattachent. Met est également présent au niveau de ces sites et interagit directement avec la E-cadhérine. L'HGF/SF permet l'endocytose conjointe de Met et de la E-cadhérine, il en résulte une diminution de l'adhésion cellule-cellule qui faciliterait la migration induite par le ligand (voir Figure 8) (Hiscox and Jiang, 1999; Kamei et al., 1999; Reshetnikova et al., 2007).

c) La Plexine B, un homologue à Met

Les plexines B sont des récepteurs membranaires et les sémaphorines sont leurs ligands. Met et les plexines B possèdent une structure extracellulaire similaire avec des domaines SEMA, PSI et IPT communs (Gherardi et al., 2004). Ces homologies de séquence permettent aux plexines B et à Met de s'associer voire de s'activer. Ainsi, Met peut se phosphoryler en absence d'HGF/SF s'il interagit avec une plexine B en présence de son ligand, la sémaphorine 4D (voir Figure 8). La présence de Met est même nécessaire pour permettre à la sémaphorine 4D d'induire des réponses biologiques telles que l'angiogenèse (Conrotto et al., 2004; Giordano et al., 2002).

d) Les isoformes de CD44

Le CD44 est un récepteur de l'acide hyaluronique qui possède de nombreuses isoformes dues à des épissages alternatifs. Certaines isoformes de CD44 sont capable d'interagir avec l'HGF/SF ou Met et ont un rôle important dans la régulation de leurs réponses.

Ainsi, l'isoforme CD44v3 est capable de retenir l'HGF/SF à la surface afin de faciliter sa présentation au récepteur Met (van der Voort et al., 1999; Wielenga et al., 2000). CD44v6 quant à lui favorise la signalisation de Met en deux étapes. Tout d'abord, il est nécessaire à l'interaction entre l'HGF/SF et Met dans des cellules tumorales de pancréas où le trimère CD44v6-HGF/SF-Met permet la phosphorylation du récepteur. Ensuite, l'isoforme est indispensable à l'activation de la voie des MAPKinase (Mitogen-Activated Protein Kinase) induite par Met. En effet, la partie intracellulaire de CD44v6 permet le recrutement des protéines Ezrines, Radixines et Moesines (ERM). Les protéines ERM s'associent à l'actine du cytosquelette qui favorise l'activation de la protéine Ras et de la voie des MAPKinase (voir Figure 8) (Orian-Rousseau et al., 2002 ; Orian-Rousseau et al., 2007).

Dans des cellules endothéliales pulmonaires, CD44v10 est indispensable à la phosphorylation de Met par l'HGF/SF. Le récepteur est alors capable de recruter Tiam1, la Cortactine et Dynamine 2 au niveau de microdomaines enrichis en cavéolines, ce processus participe au renforcement de la paroi vasculaire (Singleton et al., 2007).

Le rôle physiologique de l'interaction entre les différentes isoformes de CD44 et le couple HGF/SF-Met a été démontré *in vivo*. Ainsi, bien que les souris CD44 ^{-/-} soient viables avec des phénotypes normaux, l'absence d'un des deux allèles de *met* ou de l'*hgf/sf* dans ces mêmes souris entraîne la mort des embryons à la naissance, causée par une dérégulation du système nerveux respiratoire, démontrant l'importance de l'interaction entre Met et CD44 (Matzke et al., 2007).

e) Association avec FAS et orientation vers l'apoptose

Les partenaires de Met ne sont pas tous destinés à participer à la signalisation du récepteur. Ainsi, le récepteur peut être le garde fou de FAS (Fibroblast ASSociated), un récepteur de mort de la famille des TNF (Tumor Necrosis Factor). En présence de son ligand, FAS se trimérise et les domaines de mort situés sur sa partie intracellulaire permettent la formation d'un complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Ce complexe permet l'activation de caspases initiatrices qui mèneront à la mort cellulaire par apoptose. Dans les

hépatocytes, l'interaction de Met et de FAS empêche le recrutement du ligand de FAS et prévient la mort cellulaire. A l'inverse, la présence d'HGF/SF dans ces cellules libère FAS qui est alors libre d'interagir avec son ligand (voir Figure 8). L'HGF/SF est donc capable d'induire l'apoptose en libérant ce récepteur de mort (Shimizu et al., 2001; Wang et al., 2002).

f) La décorine et LRIG induisent la dégradation de Met

Alors que les autres interactants de Met permettent de réguler les réponses biologiques, la décorine et LRIG (Leucine-rich Repeats and ImmunoGlobulin-like domains) sont capables d'inhiber l'activation du récepteur en induisant sa dégradation (voir Figure 8).

La décorine est un protéoglycane extracellulaire de la famille des SLRP (Small Leucin-Rich Proteoglycan) qui est impliqué dans la dégradation de Met *via* deux mécanismes distincts. Dans le premier, la décorine induit la phosphorylation du récepteur qui recrute alors CBL (Casitas B-lineage Lymphoma), une E3 ubiquitine ligase également responsable de la dégradation de Met dépendante du ligand. De façon concomitante, le deuxième mécanisme est capable d'induire un clivage proche de la membrane, appelé élagage, qui sépare le domaine extracellulaire du domaine kinase (Goldoni et al., 2009).

LRIG est une protéine transmembranaire riche en leucines et en domaines similaires aux immunoglobulines. Elle induit la dégradation de Met indépendamment de l'HGF/SF et du recrutement de CBL. Des études complémentaires devront être menées pour comprendre son mécanisme d'action (Shattuck et al., 2007).

La décorine et LRIG sont toutes deux capables de diminuer le nombre de récepteurs et pourraient donc inhiber l'action tumorigène de Met. Il serait alors intéressant de mieux comprendre leur mode d'action et leur rôle physiologique.

B- Sous la surface...

L'activation du récepteur par son ligand induit le recrutement des partenaires intracellulaires de Met. Débute alors un ballet incessant de phosphorylations, de recrutements et de déplacements organisé en un réseau complexe de voies de signalisation. L'activité de ce réseau ne s'interrompt pas lors de l'internalisation du récepteur, elle se maintient et acquiert même de nouvelles fonctions durant le cheminement de Met. Le récepteur aboutit finalement au lysosome où il sera dégradé.

1) Les cascades de signalisation

L'HGF/SF induit l'autophosphorylation des tyrosines 1234 et 1235 du domaine kinase de Met. L'activation de ce domaine permet de phosphoryler les tyrosines 1349 et 1356 situées dans le domaine C-terminal. Ces deux résidus sont appelés site de recrutement multi-substrat car leur phosphorylation permet d'interagir avec la majorité des partenaires intracellulaires de Met (Ponzetto et al., 1994). Ainsi, des souris KI de Met muté sur les tyrosines 1349 et 1356 ont un phénotype similaires aux souris KO de Met (Maina et al., 1996). Le site de recrutement multi-substrat a donc une importance capitale dans les réponses du récepteur. Il a cependant été montré que les récepteurs mutés sur les tyrosines 1349 et 1356 sont toujours capables d'induire la dispersion dans des cellules épithéliales (Tulasne et al., 1999). Les partenaires de Met les plus étudiés sont Grb2, GAB1, SHC et la sous-unité p85 de la PI3kinase. Ces protéines de signalisation possèdent des domaines d'interaction comme SH2 (Src Homology 2), MBD (Met Binding Domain) et PTB (Phosphotyrosine Binding) capable de reconnaître spécifiquement les tyrosines phosphorylées du récepteur.

Lorsque le récepteur Met phosphoryle ses partenaires, ceux-ci sont alors dans une conformation active leur permettant de recruter ou de phosphoryler à leur tour d'autres protéines de signalisation. Le signal induit par l'HGF/SF est donc relayé et amplifié tel une cascade de signalisation jusqu'à de multiples effecteurs (facteurs de transcription, protéines modifiant le cytosquelette ou l'adhésion cellulaire). Ainsi, Met est placé au sommet d'un système pyramidal avec un grand nombre d'interactants qui amplifient le signal et une multitude d'effecteurs pour induire des réponses biologiques. Les deux cascades de signalisation les plus connues sont la voie des MAPKinases et la voie PI3Kinase/Akt qui nous serviront ici d'exemples.

a) La voie des MAPkinases

Lors de l'activation du récepteur par son ligand, la tyrosine 1356 recrute la protéine Grb2 qui est associée à la protéine SOS (Sons Of the Sevenless), un échangeur de guanidine (Li et al., 1993; Ponzetto et al., 1994). Le complexe est alors capable d'activer la protéine membranaire Ras. Ras est une protéine G et son interaction avec Grb2/SOS change la conformation Ras-GDP (Ras-Guanosine DiPhosphate) inactive en Ras-GTP (Ras-Guanosine TriPhosphate) active. La forme Ras-GTP induit une cascade de phosphorylations appelée voie des MAPKinases. Ainsi, Ras-GTP transfère un phosphate sur la protéine Raf qui phosphoryle à son tour MEK1 (MAP/ERK kinase 1), lui-même permettant la phosphorylation de ERK

(Extracellular signal-Regulated Kinase), le dernier acteur de la voie MAPKinases. ERK a pour cible un grand nombre de substrats cytoplasmiques et permet notamment le réarrangement du cytosquelette. De plus, ERK se transloque dans le noyau afin d'activer des facteurs de transcription comme par exemple ETS1 (E Twenty-Six 1) et c-Fos (voir pour revue (Furge et al., 2000; Tulasne et al., 2002)). L'importance de cette voie de signalisation a été démontrée par l'utilisation de souris KI de Met incapable de recruter Grb2. De manière intéressante, alors que les souris KO de Met ou de l'HGF/SF meurent durant le développement, les souris KI Met^{Grb2} sont viables jusqu'à la naissance avant de succomber à cause d'un déficit musculaire. Ce phénotype est dû à un défaut de prolifération des myoblastes (Maina et al., 1996). La voie de signalisation induite par Grb2 serait donc indispensable pour ce processus.

b) La voie PI3Kinase/Akt

La protéine PI3K est composée de deux sous-unités, p110 qui porte l'activité catalytique et p85 qui peut interagir directement avec les deux tyrosines du domaine de recrutement multisubstrat de Met (Vanhaesebroeck et al., 2005). Une fois complexée à Met, la PI3Kinase génère un second messager lipidique membranaire, la PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphate). PIP3 permet alors à Akt de s'ancrer à la membrane pour être activé par la kinase membranaire PDK1 (3-PhosphoInositide Dependent Protein Kinase-1). Akt est alors capable de phosphoryler les sérines et les thréonines de nombreux effecteurs. Ainsi, la voie PI3K/Akt inhibe les capacités pro-apoptotiques de certaines protéines telles que la protéine BAD (Bcl-2-Associated Death promoter) ou la pro-caspase-9 (voir pour revue (Fresno Vara et al., 2004)).

c) GAB1, au service de la signalisation

GAB1 est une protéine qui interagit directement avec la tyrosine 1349 et indirectement avec la tyrosine 1356 de Met *via* Grb2. Il s'agit d'une protéine adaptatrice servant de plateforme de recrutement aux protéines de signalisation PLC γ (PhosphoLipase C γ), SHP2 (Src Homology 2-containing tyrosine Phosphatase) et également de Grb2 et de la PI3Kinase (Lock et al., 2003; Lock et al., 2000; Schaeper et al., 2000). De manière générale, GAB1 potentialise les réponses du récepteur, elle prolonge par exemple l'activité des voies de signalisation MAPKinase. Les souris KO GAB1 ont un phénotype très similaire à celui du KO Met. Cela suggère que GAB1 est nécessaire à l'ensemble des voies de signalisation et

processus physiologiques induits par Met, ce qui fait de GAB1 un partenaire majeur du récepteur (Sachs et al., 2000).

d) Les prédispositions des voies de signalisation

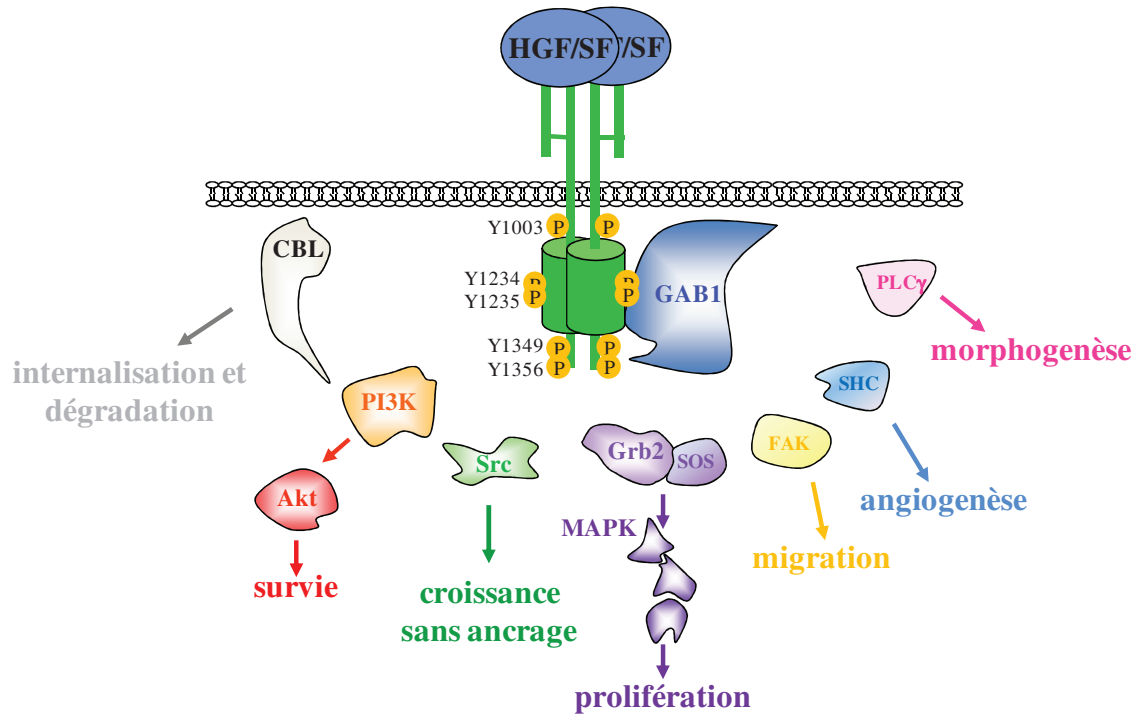


Figure 9: Réponses biologiques associées aux protéines de signalisation du couple HGF/SF-Met

Si GAB1 semble nécessaire aux différentes réponses biologiques, les autres protéines de signalisation recrutées sont plus particulièrement associées à une réponse donnée. Ainsi, le remplacement chez la souris de la forme sauvage de Met par des formes mutés recrutant préférentiellement Src, la PI3K ou Grb2 a des conséquences différentes sur le développement (Maina et al., 2001). Il a également été montré que la voie des MAPKinases régule préférentiellement la prolifération tandis que la voie PI3Kinase/Akt est plutôt impliquée dans la survie. Des prédispositions sont également rencontrées pour d'autres protéines recrutées : Src est nécessaire à la croissance sans ancrage (Rahimi et al., 1998), SHC (Src Homology 2 domain-Containing) favorise l'angiogenèse (Saucier et al., 2004), PLCγ (PhosphoLipase Cγ) est essentiel à la morphogenèse (Gual et al., 2000) et FAK (Focal Adhesion Kinase) favorise la migration (Chen and Chen, 2006) (voir Figure 9). Cependant, les voies de signalisation sont interconnectées et il est donc plus juste de considérer que l'ensemble des voies de signalisation participent conjointement aux réponses biologiques de Met.

e) Les signalisations post-internalisation

Met est capable d'induire les cascades de signalisation depuis la membrane plasmique. Cependant, le récepteur poursuit son action lors de son internalisation puis dans les endosomes précoces. Par la suite, le récepteur est déphosphorylé par la PKC ϵ (Protein Kinase C ϵ). La voie des MAPK n'est alors plus induite et la protéine ERK, auparavant située dans le noyau et le cytoplasme, se repositionne au niveau des points focaux. Ce repositionnement permet alors d'améliorer la réponse de migration induite par l'HGF/SF (Kermorgant et al., 2004).

Le récepteur situé dans l'endosome peut également interagir avec la PKC α . Cette seconde isoforme de PKC s'associe aux faisceaux de microtubules et oriente l'endosome vers la zone périnucléaire (Kermorgant et al., 2003). La proximité du complexe de signalisation de Met et du noyau permet alors à la protéine STAT3 (Signal Transducers and Activator of Transcription 3) de se transloquer sous sa forme active (Kermorgant and Parker, 2008). STAT3 est alors capable d'induire la transcription de différents gènes cibles dans le compartiment nucléaire (Boccaccio et al., 1998; Levy and Darnell, 2002).

Une autre initiation de voie de signalisation est spécifiquement initiée dans les endosomes précoces. Dans ces vésicules, la protéine Tiam-1 (T lymphoma invasion and metastasis-1) active spécifiquement Rac une protéine G. Rac est alors dirigé vers les zones de repliement des cellules (« ruffles ») et permet la migration des cellules en remodelant l'actine (Palamidessi et al., 2008).

L'internalisation amplifie donc la signalisation induite par récepteur en induisant de nouvelles fonctions depuis l'endosome précoce et la zone périnucléaire des cellules. Cependant, par son internalisation, Met se rapproche également de son lieu de dégradation.

2) La dégradation dépendante du ligand

a) L'internalisation

Suite à l'activation de Met par son ligand, le récepteur subit une dégradation qui atténue ses capacités de signalisation. Le domaine juxtamembranaire intracellulaire, codé par l'exon 14, joue un rôle prépondérant dans ce mécanisme. Ainsi, en présence de ligand, le récepteur Met délété de l'exon 14 présente une dégradation moins importante que le récepteur entier (Asaoka et al., ; Kong-Beltran et al., 2006). Dans ce même domaine, le résidu tyrosine 1001 s'autophosphoryle en réponse au ligand (Weidner et al., 1995). La phosphorylation de cette

tyrosine permet le recrutement de la protéine c-CBL, une E3 ubiquitine ligase, connue pour être impliquée dans la dégradation de nombreux RTK (Peschard et al., 2001). Le recrutement de cette E3 ubiquitine ligase par le récepteur est l'élément clef permettant d'aiguiller le couple HGF/SF-Met vers sa dégradation (voir Figure 10). La phosphorylation de CBL induit alors le recrutement de la protéine CIN-85 (Cbl-interacting protein of 85K) et de l'endophiline. Ces deux protéines sont nécessaires au recrutement des clathrines, ce qui permet à la membrane de s'incurver. Le complexe formé permet alors l'invagination de la membrane recouverte de clathrine au niveau de Met et de ses partenaires. L'internalisation se poursuit jusqu'à l'obtention d'une vésicule intracellulaire nommée endosome précoce (Petrelli et al., 2002).

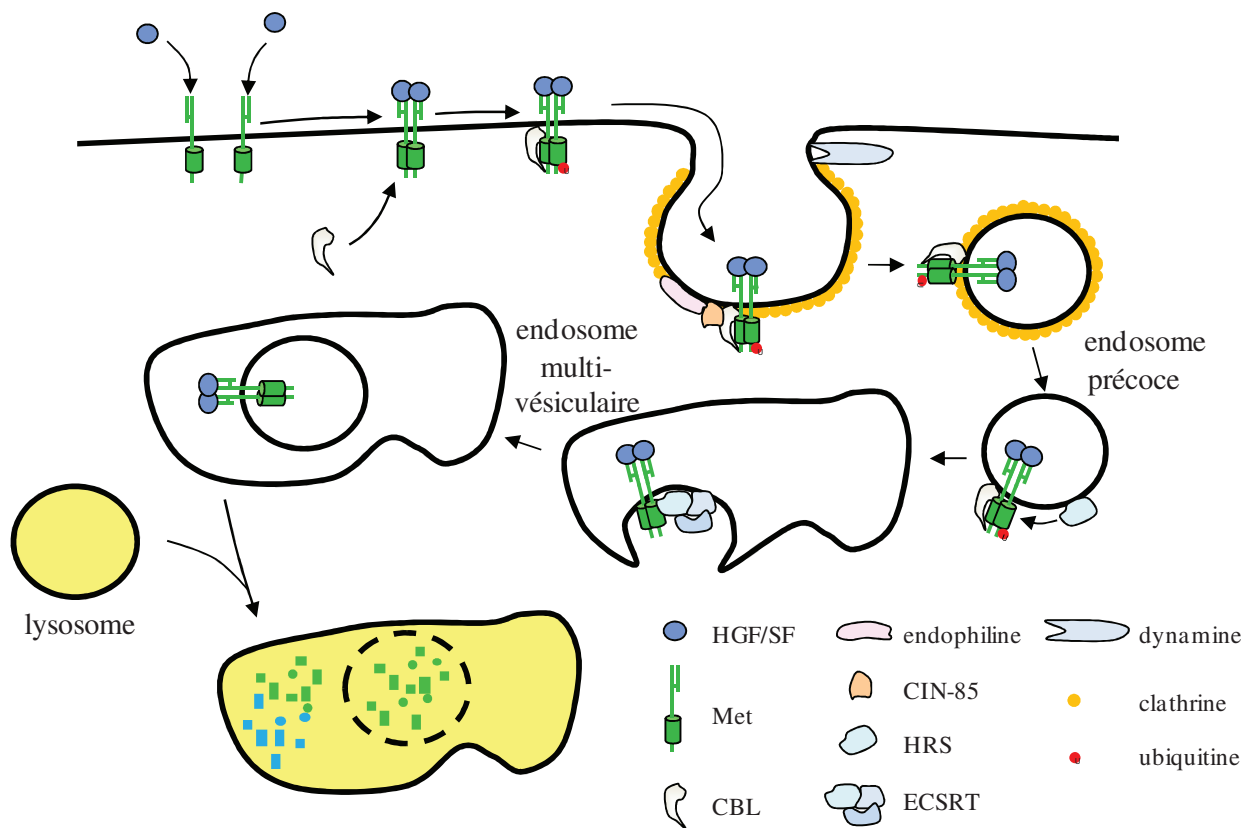


Figure 10: Dégradation du récepteur Met en présence d'HGF/SF
(D'après (Abella and Park, 2009))

b) Transporté jusqu'au lysosome

La protéine CBL permet également l'ubiquitinylation du récepteur. Dans l'endosome, cette modification post-traductionnelle permet la prise en charge de Met par la protéine HRS (HGF-Regulated tyrosine kinase Substrate) (Komada and Kitamura, 1995). Couplées à Met, HRS ainsi que les autres protéines ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) permettent à la membrane de l'endosome de s'invaginer à son tour. Les vésicules intra-luminales (ILV) formées isolent alors Met de la machinerie de signalisation (Tanaka et al., 2008). La nouvelle structure renfermant les ILV est nommée endosome multi-vésiculaire (MVE) et évolue jusqu'à devenir un endosome tardif.

La dernière phase de ce mécanisme est la fusion de l'endosome tardif avec le lysosome (Raiborg and Stenmark, 2009). Ce compartiment intracellulaire possède un pH acide, dû à l'action de pompe à protons, qui permet l'activation d'un grand nombre d'hydrolases. Le lysosome permet la dégradation de nombreux lipides et protéines dont le récepteur Met. Il a ainsi été montré que l'inhibition des pompes à protons empêche la dégradation du récepteur induite par le ligand (Abella et al., 2005; Hammond et al., 2001).

Le couple HGF/SF-Met est capable de modifier la réponse d'une cellule grâce aux nombreuses voies de signalisation qu'il induit. La dégradation participe au contrôle de la réponse en atténuant le signal émis par le récepteur. Cependant, l'équilibre entre l'action et la dégradation du récepteur peut basculer, la dérégulation de la signalisation de Met aboutit alors à la tumorigénèse.

IV- Le couple HGF/SF-Met et le cancer

Le lien entre Met et les cancers existe depuis l'identification de la chimère TPR-Met qui permet la transformation de fibroblastes NIH-3T3 (Cooper et al., 1984). Au fil des années, le récepteur Met et son ligand ont été de plus en plus étudiés et leur lien avec les cancers n'ont cessé de se renforcer. De la recherche fondamentale aux essais cliniques, ces travaux aboutissent aujourd'hui à la production d'agents anti-tumoraux sur le point d'être utilisés en thérapie.

A- HGF/SF et Met perdent le contrôle

L'activité oncogénique de Met peut avoir des causes différentes : des mutations activatrices, la surexpression du récepteur ou du ligand conduisant, par exemple, à la formation d'une boucle autocrine avec l'expression simultanée de l'HGF/SF et de Met. Dans tous les cas, le récepteur est alors suractivé et potentiellement transformant.

1) Mutations

Un lien direct entre Met et le cancer fut établi lorsque des mutations activatrices du récepteur ont été mises en évidence chez des patients atteints de carcinomes papillaires rénaux héréditaires (Schmidt et al., 1997). Ensuite, d'autres mutations de Met ont été répertoriées dans un grand nombre de cancers somatiques. Actuellement, on en dénombre 135 dans la séquence nucléotidique (Nt) qui correspondent à 38 mutations de la séquence protéique (Pr). Ces mutations sont réparties sur trois régions du récepteur: la partie extracellulaire (26 Nt/10 Pr), le domaine juxtamembranaire (29 Nt/8 Pr) et le domaine kinase (80 Nt/20 Pr) (voir Figure 11 et le site <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>).

Les mutations de la partie extracellulaire sont majoritairement retrouvées dans des cellules tumorales pulmonaires, la plupart situées dans le domaine SEMA et certaines dans les domaines IPT (Finegold et al., 2008; Jagadeeswaran et al., 2006; Ma et al., 2008). Il a été suggéré que ces mutations modifient la structure du récepteur et permettent une dimérisation constitutive activatrice (Ma et al., 2005). Cependant, les mutations testées n'entraînent pas l'activation du récepteur et certaines diminuent même l'interaction avec le ligand (Krishnaswamy et al., 2009). Le mécanisme d'action de ces mutations oncogéniques reste donc à élucider.

Les mutations situées dans le domaine juxtamembranaire ne semblent pas influencer sur la dimérisation ou l'activité du domaine kinase. Néanmoins, il est connu que cette région est nécessaire à la dégradation du récepteur après son activation par le ligand. Il a été montré que des mutations introniques induisent la délétion de l'exon 14 qui code la partie intracellulaire du domaine transmembranaire. Le récepteur présente alors un défaut de dégradation et la signalisation induite par l'HGF/SF est prolongée. Par conséquent, les fibroblastes qui expriment des récepteurs Met délétés de l'exon 14 sont transformants (Asaoka et al., ; Kong-Beltran et al., 2006; Ma et al., 2005; Onozato et al., 2009). De la même manière, la mutation du site de recrutement de CBL (Y1003) empêche la dégradation du récepteur. Ces formes

mutées prolongent la cinétique de signalisation des voies MAPkinase et sont également transformantes (Abella et al., 2005; Peschard et al., 2001). Trois mutations juxtamembranaires, R988C, P1009S et T1010I, sont également retrouvées dans des cancers mais n'induisent pas d'activation constitutive du récepteur (Ma et al., 2003; Tyner et al.). Leur potentiel oncogénique a pourtant été démontré dans des modèles animaux. En effet, dans des souris immunodéprimées, l'injection de fibroblastes NIH-3T3 exprimant ces formes mutées de Met induit des tumeurs (Lee et al., 2000; Ma et al., 2003; Ma et al., 2008). Cependant, le mode d'action de ces mutations reste encore inconnu.

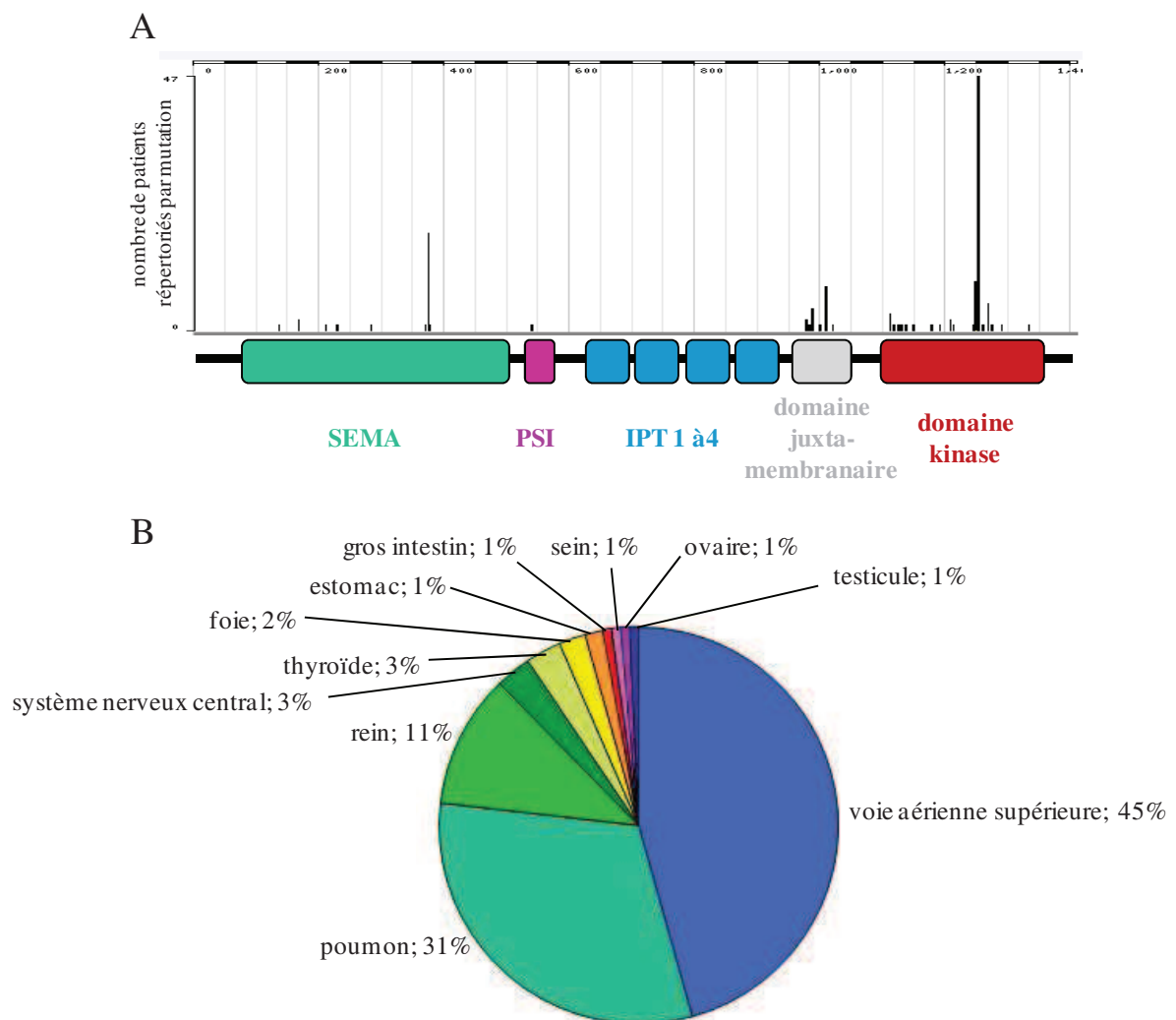


Figure 11: Mutations de Met identifiées chez l'Homme

(A) Localisation et nombre de patients répertoriés par mutation. (B) Répartition en pourcentage des mutations de Met selon les organes. (D'après le site <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>).

Plus de la moitié des mutations de Met retrouvées dans les cancers concerne le domaine kinase du récepteur. Les mutations de ce domaine sont généralement observées dans les tumeurs des voies digestives supérieures et des reins, comme c'est le cas dans les carcinomes papillaires rénaux héréditaires (Jeffers et al., 1998; Schmidt et al., 1997). Les mécanismes d'action des mutations du domaine kinase sont divers. Il a ainsi été montré que certaines de ces mutations augmentent l'activité kinase de Met ou activent le récepteur sans phosphoryler les tyrosines 1234 et 1235 (Cristiani et al., 2005; Jeffers et al., 1997; Jeffers, 1999). Il a été proposé que des mutations du domaine kinase permettent la phosphorylation du récepteur avec une faible concentration d'HGF/SF ce qui augmenterait l'activité de Met en réponse au ligand (Chiara et al., 2003). La principale mutation, Y1253D, est présente dans 10% des cancers des voies digestives supérieures documentés (Aebersold et al., 2003). La majorité des mutations du domaine kinase, dont Y1253D, ont des caractéristiques communes. Les récepteurs portant ces mutations sont constitutivement phosphorylés bien que l'intensité de leur activité kinase soit variable. Ils induisent la transformation des NIH-3T3 et sont capables de former des tumeurs dans les souris immunodéprimées (Jeffers et al., 1997). De plus, l'expression du récepteur sauvage a pu être remplacée par celle de récepteurs mutés dans des souris KI. Les souris exprimant ces récepteurs mutés développent de nombreux cancers, principalement des lymphomes et des sarcomes mais également des carcinomes, ce qui confirme les capacités tumorigènes de ces mutations. De manière intéressante, la plupart des cellules tumorales issues de ces KI ont également une duplication du gène *met*, il a ainsi été proposé qu'en plus de la mutation du récepteur, l'augmentation du nombre de copies de Met soit une étape nécessaire à la tumorigenèse (Graveel et al., 2004).

2) Surexpression

Bien qu'il existe de nombreuses mutations de Met, la surexpression du récepteur est retrouvée dans la majorité des cancers l'impliquant. Le pourcentage de tumeurs où Met est surexprimé varie selon les organes touchés et les études. Par exemple, dans une étude sur les cancers du poumon, la surexpression de Met est observée dans la quasi totalité des cancers à non petites cellules et dans 67 % des adénocarcinomes (Ma et al., 2005). Dans les cancers du sein, ce taux oscille entre 20 et 30% (Garcia et al., 2007; Ghossoub et al., 1998) et, dans des carcinomes rénaux, il monte à 80% (Natali et al., 1996).

L'expression importante de Met peut être due à une amplification génique. De multiples copies de Met sont retrouvées dans 10 à 20 % des cancers gastriques (Smolen et al., 2006),

dans des cancers colorectaux et des métastases hépatiques (Zeng et al., 2008) ainsi que dans des cancers du poumon (Toschi and Cappuzzo). La multiplication des gènes de Met entraîne une accumulation de récepteur pouvant provoquer une activation de Met en absence du ligand. Ainsi, les cellules tumorales gastriques GTL-16 possèdent 11 copies de *met* (Herrick et al., 2000), ce qui génère une phosphorylation constitutive du récepteur. *In vitro*, les GTL-16 sont capables de croître sans ancrage, une caractéristique transformante, et, *in vivo*, elles sont capables de former des tumeurs dans les souris immunodéprimées. Cependant, des surexpressions du récepteur sont observées sans amplification génique de *met*.

Ainsi, la transcription du gène *met* peut être induite par l'activation de la voie des MAPKinase *via* Ras ou par la fixation du facteur de transcription ETS1 sur le promoteur du récepteur. Dans les cellules tumorales, ces deux oncogènes permettent donc la surexpression de Met. Le récepteur est alors activé indépendamment du ligand et amplifie l'action de Ras et d'ETS1, créant une boucle d'autoactivation (Gambarotta et al., 1996; Ivan et al., 1997).

Un autre mécanisme de surexpression est lié à une classe de molécules régulant négativement le taux d'ARN messager de Met, il s'agit des microARN (miARN). Les miARN sont des petits brins d'ARN non-codant (21 à 24 nucléotides) qui reconnaissent la séquence 3' UTR (UnTranslated Region) de nombreux ARNm et empêchent leur traduction ou permettent leur dégradation. Il a été montré que p53, un facteur de transcription suppresseur de tumeur, permet la transcription du miARN miR-34b. Or miR-34b inhibe la traduction de l'ARNm de Met et diminue donc l'expression du récepteur. Ainsi, il a été proposé que l'inactivation de p53, observée dans la moitié des cancers chez l'humain, puisse augmenter l'expression de Met *via* la perte de miR-34b (Migliore et al., 2008).

L'hypoxie peut également être responsable de la surexpression de Met (Pennacchietti et al., 2003). Ce phénomène apparaît notamment lors de la vascularisation de la tumeur où le réseau sanguin développé est anarchique avec des vaisseaux mal organisés et perméables. Une partie des cellules tumorales n'est pas suffisamment irriguée et ne capte que peu de nutriments et d'oxygène créant ainsi des conditions hypoxiques. HIF α (Hypoxia Inducible Factors α) est une protéine clef permettant de contrebalancer ce phénomène. Dans des conditions normales, HIF α est rapidement dégradée. En condition d'hypoxie, cette protéine est stabilisée et recrute HIF β , le dimère formé est alors transloqué dans le noyau. HIF α/β permet la transcription de *met* et d'autres gènes cibles qui contrecarrent l'hypoxie. Les protéines exprimées sont impliquées dans la survie, comme Met, mais également dans

l'angiogenèse, l'érythropoïèse et le transport de glucose, le tout favorisant la croissance tumorale en dépit des conditions hypoxiques (Scarpino et al., 2004).

Les mécanismes décrits font intervenir des modifications géniques, des oncogènes ou l'environnement tumoral ; des origines diverses qui suggèrent une grande variabilité dans les causes de la surexpression du récepteur. Beaucoup de mécanismes restent donc à découvrir ce qui pourrait ouvrir de nouvelles voies pour lutter contre les cancers liés à Met.

3) Activation paracrine ou autocrine de Met ?

Une augmentation du taux d'HGF/SF est observée dans les tumeurs et dans le serum de patients atteints de cancers du sein, du poumon, de l'estomac, du colon et des cellules gliales. Cette augmentation est souvent corrélée à un mauvais pronostic (Arrieta et al., 2002; Niki et al., 1999; Siegfried et al., 1997; Toi et al., 1998; Toiyama et al., 2009; Yamashita et al., 1994). De plus, l'HGF/SF et Met sont conjointement détectés dans certaines tumeurs ce qui implique une régulation paracrine ou autocrine du ligand sur son récepteur (Fukuda et al., 1998; Koochekpour et al., 1997; La Rosa et al., 2000; Tuck et al., 1996) (voir Figure 12).

Ainsi, la capacité tumorigène de la régulation autocrine de l'HGF/SF sur Met a été évaluée dans des modèles de xénogreffes. L'injection dans des flancs de souris de cellules exprimant le récepteur, son ligand ou les deux conjointement génère des tumeurs primaires aux tailles similaires. Cependant, l'expression conjointe de l'HGF/SF et de Met favorise l'angiogenèse et le développement métastatique (Navab et al., 2009; Rong et al., 1994). De plus, dans un modèle d'expression conditionnelle chez des souris, l'expression de l'HGF/SF et de Met dans des cellules épithéliales mammaires induit la formation de tumeurs et de métastases (Gallego et al., 2003). L'expression conjointe de Met et de l'HGF/SF a donc un fort potentiel tumorigène.

Pour confirmer que cette régulation autocrine existe dans des cancers, il est nécessaire d'identifier des cellules tumorales exprimant à la fois le récepteur et son ligand. Cependant, le manque de précision des immunohistochimies ne permet pas de distinguer une régulation autocrine d'une régulation paracrine. En effet, l'HGF/SF détecté dans les tumeurs peut provenir de l'environnement tumoral. Il est néanmoins possible de mesurer les ARNm de Met et de l'HGF/SF (Tokunou et al., 2001; Tsao et al., 2000; Tuck et al., 1996) ou de mettre en culture des cellules tumorales afin de détecter l'expression du récepteur et de son ligand (Ferracini et al., 1995; Ferracini et al., 1996; Park et al., 2005; Rong et al., 1995).

Globalement, ces études démontrent que peu de cellules tumorales expriment à la fois Met et son ligand, suggérant une activation majoritairement paracrine. Le ligand est sécrété par des cellules saines du microenvironnement tumoral comme les cellules vasculaires (musculaires lisses et endothéliales), les cellules de la réponse immunitaire (neutrophiles et macrophages) mais surtout par les fibroblastes (voir pour revue (Jiang et al., 1999)). L'augmentation du taux d'HGF/SF est due à la sécrétion d'inducteurs par les cellules tumorales. Ces inducteurs sont l'interleukin-1 β (IL-1 β), le Fibroblast Growth Factor b (FGF), le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), le Transforming Growth Factor- α (TGF- α) et la prostaglandine E2 (PGE2), des facteurs favorisant également la tumorigenèse en augmentant l'angiogenèse, la réponse inflammatoire et la prolifération des fibroblastes (Jiang et al., 1999; Matsumoto and Nakamura, 2006).

catégorie	type de cancers	expression d'HGF/SF	expression de Met	mauvais pronostic	mutation de Met
carcinome	vessie	x	x	x	
	sein	x	x	x	x
	cervical	x	x	x	
	voies biliaires	x	x		
	colorectal	x	x	x	
	endomètre	x	x		
	œsophage	x	x	x	
	gastrique	x	x	x	x
	tête et cou	x	x	x	x
	foie	x	x	x	x
	nasopharynx	x	x	x	
	ovaire	x	x	x	x
	pancréas	x	x		
	prostate	x	x	x	
	thyroïde	x	x	x	x
sarcome de l'appareil locomoteur	ostéosarcome	x	x		x
	rhabdomyosarcome	x	x	x	
	sarcome synovial	x	x	x	
sarcome des tissus mous	sarcome de Kaposi	x	x		
	sarcome des muscles lisses	x	x	x	
	fibrosarcome	x	x		
hémopathie maligne	leucémie myéloïde aigue	x			
	leucémie à cellules T de l'adulte	x	x	x	
	leucémie myéloïde chronique	x			
	lymphome	x	x	x	x
	myélome multiple	x	x	x	
autres tumeurs	glyoblastome/astrocytome	x	x	x	x
	mélanome	x	x	x	
	mésothéliome	x	x	x	
	tumeur de Wilm	x	x		

Figure 12: Tableau des cancers impliquant HGF/SF et Met
(D'après le site <http://www.vai.org/met.>)

Les cancers liés à Met proviennent généralement de la dérégulation du récepteur. Cependant, l'environnement tumoral favorise aussi l'expression de l'HGF/SF et amplifie donc l'action tumorigène du récepteur. De manière intéressante, l'action de Met peut devenir prédominante voire indispensable dans des cellules tumorales, on parle alors de dépendance à Met.

B- Notion d'addiction à Met

Les cellules tumorales sont qualifiées de dépendantes lorsqu'elles cessent de proliférer ou meurent suite à la perte de l'activité d'un oncogène (Weinstein and Joe, 2008). Or, il a été montré que la diminution de l'expression de Met par siRNA (small interfering RNA RiboNucleic Acid) ou par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques dirigés contre le récepteur abolit la prolifération ou entraîne la mort de certaines lignées cellulaires (Christensen et al., 2003 ; Smolen et al., 2006). Les cellules répondant à ces critères, et donc considérées comme dépendantes du récepteur, sont peu nombreuses, 7 sur un panel de 500 lignées de cellules épithéliales cancéreuses. Les 7 lignées possèdent toutes une forte amplification du gène *met*, ce qui suggère un rapport entre la dépendance de Met et le nombre de copies du récepteur (McDermott et al., 2007). De plus, une analyse globale des protéines de signalisation dans ces cellules montre que l'inhibition de Met affecte principalement les voies MAPKinase et PI3K/Akt. L'activation constitutive de chacune des deux voies permet d'ailleurs de compenser l'inhibition de Met et confirme leur lien avec la dépendance de Met. Ces deux voies sont également impliquées dans les cellules dépendantes à l'EGFR, ce qui suggère une signature commune entre les différentes lignées cellulaires dépendantes de Met et de l'EGFR (Bertotti et al., 2009).

C- Met et les membres de la famille des récepteurs à l'EGF

Bien qu'un rôle central de Met ai pu être mis en évidence dans quelques lignées cellulaires, dans la grande majorité des cas, c'est l'action combinée de plusieurs oncogènes qui mène à la transformation cellulaire. Ainsi, la dérégulation de plusieurs membres de la famille des RTK est souvent identifiée dans les cancers. Dans ce contexte, il a été montré qu'un dialogue existe entre Met et l'EGFR. L'EGFR est retrouvé dans de nombreuses tumeurs et des inhibiteurs de l'EGFR ont déjà démontré leur efficacité dans différentes études cliniques. Par exemple, le gefitinib, un mimétique de l'ATP permettant d'inhiber l'activation du domaine kinase de l'EGFR, est connu pour son efficacité dans le traitement des cancers du poumon à non petites cellules. Cependant, les patients traités par cet inhibiteur développent

des résistances dues à des mutations de l'EGFR (50%) et à la surexpression de Met (22%). Cette surexpression de Met permet l'activation d'un autre récepteur à l'EGFR, ErbB3, ainsi que de la protéine de signalisation Akt ce qui favorise la survie et la prolifération des cellules tumorales (Engelman et al., 2007). Un mécanisme similaire est observé avec le trastuzumab, un anticorps bloquant l'activité du récepteur ErbB2. Les résistances qu'induit cet outil sont corrélées à une augmentation de l'expression de Met mais le mécanisme n'est pas encore compris (Shattuck et al., 2008). A l'inverse, il a été démontré que l'activation des récepteurs EGFR et ErbB3 permet à des cellules dépendantes de Met d'échapper à l'inhibition du récepteur (Bachleitner-Hofmann et al., 2008). Les RTK semblent donc capables de se relayer afin de surmonter l'inactivation de l'un d'eux lors de progressions tumorales

Il a également été montré que deux récepteurs peuvent coopérer directement. Ainsi, différents membres de la famille des récepteurs à l'EGF (EGFR, ErbB2 et ErbB3) sont capables d'activer Met et inversement (voir pour revue (Lai et al., 2009)). Il a même été suggéré que Met et l'EGFR forment un complexe hétérodimérique actif dans des cellules tumorales de l'épiderme ou du poumon (Guo et al., 2008; Jo et al., 2000).

D- Met est une cible thérapeutique

De nombreux outils ont été développés afin d'inhiber l'action tumorale de Met. Issus des recherches fondamentales effectuées sur le récepteur, des outils thérapeutiques ont été développés autour de différents axes : les molécules antagonistes, les anticorps bloquants et les inhibiteurs du domaine kinase (voir Figure 13). Pour la recherche clinique, certains critères doivent être respectés pour que ces molécules puissent être administrées au patient : elles ne doivent pas provoquer d'effets secondaires mettant en jeu la vie des patients, doivent être bien distribuées et préférentiellement administrées par voie orale.

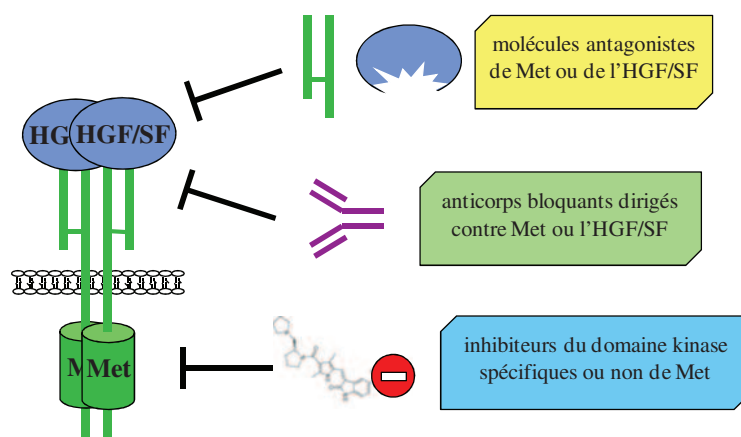


Figure 13: Différents modes d'inhibition du couple HGF/SF-Met

1) Molécules antagonistes de l'HGF/SF et de Met

Les molécules antagonistes sont capables d'interférer l'action de l'HGF/SF sur Met afin d'inhiber les fonctions du récepteur. La molécule NK2 est un antagoniste de l'HGF/SF secrété naturellement par l'organisme. Elle comprend le domaine N-terminal et les deux premiers domaines krigle de la sous-unité α de l'HGF/SF (Chan et al., 1993). NK2 est capable de se fixer au récepteur et d'empêcher son activation par l'HGF/SF (Montesano et al., 1998). Deux autres molécules antagonistes ont été créées sur le modèle de NK2 : NK4, correspondant à la sous-unité α de l'HGF/SF (Matsumoto and Nakamura, 2003; Matsumoto and Nakamura, 2008) et une forme non-clivable de l'HGF/SF, capables de se fixer au récepteur mais pas de l'activer (Mazzone et al., 2004). Il a notamment été montré que NK4 a des effets anti-angiogéniques qui diminue la vascularisation de la tumeur et a donc une action anti-tumorale.

Les molécules antagonistes peuvent également être des formes tronquées de Met qui interagissent avec l'HGF/SF et avec le domaine extracellulaire du récepteur. Ainsi, une construction correspondant au domaine extracellulaire de Met, appelée « leurre » (« decoy » en anglais) (Michieli et al., 2004), et une molécule rSEMA comprenant le domaine SEMA et PSI du récepteur ont été générées (Kong-Beltran et al., 2004). Ces constructions sont capables d'inhiber les différentes réponses induites par l'HGF/SF sur des cultures cellulaires comme la dispersion, la migration, la survie et la morphogénèse. De plus, elles sont capables d'inhiber ces mêmes réponses dans des cellules où l'action de Met est indépendante du ligand car elles forment des hétérodimères inactifs avec le récepteur endogène. *In vivo*, les antagonistes de Met testés ont fortement inhibé la croissance tumorale et la formation de métastases dans des modèles de xénogreffes de cellules tumorales humaines chez la souris. Les différents antagonistes de Met et de l'HGF/SF sont donc des outils thérapeutiques potentiels.

2) Anticorps bloquants

De manière générale, les anticorps bloquants reconnaissent les régions d'interaction entre Met et l'HGF/SF, ils empêchent ainsi l'activation du récepteur par son ligand. Les essais pré-cliniques de ces anticorps ont montré de bons résultats sur l'inhibition des réponses biologiques de Met *in vitro* ainsi que des effets anti-tumoraux dans des modèles de xénogreffes de cellules tumorales humaines chez la souris.

Les anticorps AMG102, SCH900105/AV-299 et TAK-701 sont capables de fixer l'HGF/SF (voir pour revue (Liu et al.)). Les essais cliniques sont les plus avancés pour

l'AMG102 (voir Figure 14). Son test en phase I montre qu'il est bien toléré et bien distribué. Il a même permis un arrêt de la progression tumorale chez 16 des 23 patients évalués dans un essai sur des tumeurs solides (Gordon et al.). Cependant une étude en phase II sur des glioblastomes semble lui attribuer peu d'effets. D'autres essais de phase II sont en cours mais en association avec d'autres agents anti-tumoraux dans des cancers pulmonaires, gastriques, colorectaux, prostatiques ou encore œsophagiens (voir le site <http://clinicaltrials.gov>).

D'autres anticorps, qui ciblent la partie extracellulaire de Met, sont capables d'inhiber l'interaction entre le récepteur et son ligand. Cependant, ils sont également capables d'induire la dimérisation et l'activation de Met. En effet, chaque bras de l'anticorps fixe un récepteur et force donc la dimérisation comme c'est le cas pour l'anticorps 5D5. Le problème a été résolu en n'utilisant qu'un seul bras de l'anticorps. Cette nouvelle version du 5D5, baptisée MetMAB, empêche alors efficacement l'activation par l'HGF/SF sans induire de dimérisation (Jin et al., 2008; Martens et al., 2006). Des essais cliniques en cours montrent que le MetMAB/5D5 est bien toléré mais les résultats préliminaires de phase II suggèrent une action restreinte en traitement unique (voir pour revue (Liu et al.)).

Un autre anticorps, le DN30, est également dirigé contre la partie extracellulaire de Met mais n'entre pas en compétition avec l'HGF/SF (Prat et al., 1998). De plus, tout comme le 5D5, le DN30 phosphoryle le récepteur. Pourtant, cet anticorps agit comme une molécule antagoniste. En effet, il inhibe efficacement la croissance sans ancrage *in vitro* et la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffes chez la souris. En fait, il a été démontré que le DN30 permet de dégrader le récepteur Met en induisant son clivage (Petrelli et al., 2006), un mécanisme dont nous parlerons plus longuement dans les résultats de ma thèse. Le brevet de cet anticorps a été cédé récemment à un groupe pharmaceutique et des essais cliniques de phase I seront prochainement lancés.

En conclusion, les antagonistes de l'HGF/SF et de Met semblent bien tolérés chez les patients mais les premiers résultats sur la progression tumorale sont mitigés. Cependant, les faibles effets secondaires observés, sûrement dus à la spécificité de ces anticorps pour l'HGF/SF ou Met, ont permis d'envisager leur association avec d'autres traitements anti-tumoraux. Ainsi, d'autres études devront déterminer si ces anticorps pourront être utilisés en monothérapie ou couplés avec d'autres outils thérapeutiques.

3) Inhibiteurs du domaine kinase

De petites molécules pharmacologiques ciblant le domaine catalytique tyrosine kinase de Met ont été développées dans le but d'inhiber l'activité du récepteur. La grande majorité de ces inhibiteurs sont des analogues de l'ATP (Adénosine TriPhosphate), ils se positionnent dans la poche à ATP du domaine kinase et empêchent ainsi son activation. Comme le domaine kinase de Met est très proche des domaines des autres récepteurs tyrosine kinase, ces molécules sont capables d'inhiber un spectre plus ou moins large de récepteurs. Cependant, certains sont spécifiques du récepteur Met comme le PF-4317903 et le JNJ38877606. Tous deux sont actuellement en test clinique de phase I. *In vitro*, ces inhibiteurs bloquent les voies de signalisation et les réponses biologiques associées à Met. *In vivo*, ils empêchent la croissance tumorale et les métastases dans des modèles de xénogreffes chez la souris (voir pour revue (Liu et al.)).

Une autre molécule spécifique de Met, ARQ197, permet également d'inhiber le domaine kinase bien qu'il ne s'agisse pas d'un compétiteur de l'ATP. Son mécanisme d'action est encore à élucider. L'ARQ197 fait cependant l'objet de différents essais cliniques de phase I/II sur des cancers gastriques, des cancers du poumon à non petites cellules et des cancers pancréatiques (Bagai et al., ; Munshi et al.). En parallèle, un co-traitement ARQ197 et erlotinib, un inhibiteur de l'EGFR, est plus efficace dans les cancers du poumon à non petites cellules que l'erlotinib seul. Ce résultat suggère que les traitements dirigés contre plusieurs RTK sont plus efficaces que les monothérapies ; cette observation conforte l'importance du dialogue entre Met et l'EGFR dans la croissance tumorale.

Ainsi, les molécules capables d'inhiber plusieurs RTK dont Met semblent prometteuses. Ces inhibiteurs dits à large spectre sont potentiellement capables d'inhiber de 2 à 8 RTK (voir Figure 14 et pour revue (Liu et al.)). Les résultats obtenus sur l'inhibiteur le plus avancé dans les essais cliniques, le XL184/BMS907351, semblent confirmer l'efficacité d'un traitement ciblant plusieurs oncogènes. Cette molécule est capable d'inhiber 6 RTK, et en étude pré-clinique, il est efficace en co-traitement sur les cellules résistantes à des inhibiteurs des EGFR (Zhang et al.). Il est actuellement en phase II dans des cancers du poumon à non petites cellules et les glioblastomes, et en phase III dans les cancers médullaires de la thyroïde. Il améliore la durée de survie sans progression tumorale mais les effets secondaires ont parfois amené à l'arrêt du traitement.

Agent thérapeutique	RTK ciblé	Statut	Tumeurs ciblée
Anticorps bloquants			
AMG102 (Amgen)	Met	Ph II	Cancer du poumon à non petites cellules, colorectal, gliome, rein et gastrique
MetMAb (Roche)	Met	Ph II	Cancer du poumon à non petites cellules
SCH900105/AV-299 (Schering/Aveo)	Met	Ph I	
TAK-701 (Millenium)	Met	Ph I	
Inhibiteurs du domaine kinase spécifiques de Met			
ARQ197 (AsQule/Daiichi Sanyo)	Met	Ph II	Cancer du poumon à non petites cellules, pancréas
		Ph I	Hépatocarcinome cirrhotique
PF-4317903 (Pfizer)	Met	Ph I	
JNJ38877606 (JNJ)	Met	Ph I	
Inhibiteurs du domaine kinase non-spécifiques de Met			
XL184/BMS907351 (Exelixis/BMS)	Met, VEGFR, RET, KIT, FLT3 et TIE2	Ph III	Cancer de la thyroïde
		Ph II	Glioblastome, cancer du poumon à non petites cellules
PF-2341066 (Pfizer)	Met et ALK	Ph II/III	Cancer du poumon à non petites cellules exprimant des récepteurs ALK mutés
		Ph II	Lymphome anaplasique à larges cellules
XL880/GSK1363089 (GSK/Exelixis)	Met, VEGFR, AXL, PDGFR, KIT, FLT3 et TIE2	Ph II	Cancer papillaire rénal, gastrique, tête et cou
MP470 (Supergen)	Met, KIT, PDGFR, FLT-3, RET et RAD51	Ph I	
MGCD265 (Methylgene)	Met, RON, VEGFR 1/2/3 et TIE2	Ph I	
BMS-777607(BMS)	Met, RON, AXL, TYRO3 et MER	Ph I/II	
MK-2461 (Merck)	Met, FLT1, 3 et 4, FGFR, VEGFR2, Trk A et B	Ph I	
AMG308(Amgen)	Met et RON	Ph I	

Figure 14: Tableau des outils thérapeutiques inhibant Met en essais cliniques
(D'après (Liu et al.))

Un grand nombre d'agents thérapeutiques inhibant Met sont actuellement en essai clinique ou en développement. Ainsi, ils augmenteront le panel de chimiothérapies pouvant être utilisées pour lutter contre les cancers. Cependant, il est nécessaire que les caractérisations des cancers soient les plus précises possibles. Par exemple, l'identification des mutations ou de la surexpression de Met dans une tumeur pourraient être un indicateur conduisant à l'utilisation d'outils thérapeutiques ciblant Met. Il serait également intéressant d'identifier les différents oncogènes dérégulés dans les cancers afin d'utiliser des co-traitements sur mesure comme cela pourrait être le cas pour les résistances impliquant l'EGFR et Met. De nombreux travaux seront encore nécessaires pour aboutir à une telle précision de diagnostic et les essais cliniques visant les RTK ne font finalement que débuter. Beaucoup d'autres traitements et combinaisons restent à venir pour assimiler correctement le potentiel de ces nouveaux outils thérapeutiques.

V- Nouvelles fonctions de Met par clivages protéolytiques

A- Fonctions connues des fragments de RTK

Les fonctions des RTK en réponse à leur ligand ont largement été étudiées ces 30 dernières années et continuent de faire l'objet de recherches approfondies. En parallèle, il a été démontré que les RTK peuvent être la cible de protéases comme les caspases ou les métalloprotéases membranaires. Les fragments générés par ces protéases ont des localisations et des fonctions distinctes de celles des récepteurs pleine longueur et ne nécessitent pas forcément la présence de ligand. Nous avons collecté et ordonné dans une revue, où je signe en premier auteur, les résultats de travaux récents sur les fragments protéolytiques des RTK. J'ai inséré cette revue dans l'introduction pour faire un point sur les fonctions de ces fragments. Par la suite, je reviendrai plus particulièrement sur les fragments de Met générés par les caspases et par les métalloprotéases membranaires qui sont à la base de mes travaux de thèse.

Publication 1 : Proteolytic cleavages give receptor tyrosine kinases the gift of ubiquity.

Ancot F, Foveau B, Lefebvre J, Leroy C, Tulasne D.
Oncogene. 2009 Jun 4;28(22):2185-95.

REVIEW

Proteolytic cleavages give receptor tyrosine kinases the gift of ubiquity

F Ancot, B Foveau, J Lefebvre, C Leroy and D Tulasne

CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille-Institut Pasteur de Lille-Université de Lille 1-Université de Lille 2, Lille, France

Receptor tyrosine kinases (RTK) constitute a large family of membrane receptors which, in response to their respective ligand, transmit information into cells. RTK regulate multiple biological responses, and their deregulation is often associated with tumourigenesis. The intracellular signalling pathways initiated by full-length membrane RTK are studied extensively, but many RTK fragments showing unexpected cellular localization have been observed. These fragments are generated by proteolytic cleavages, catalyzed notably by caspases, membrane metalloproteases or γ -secretase. Interestingly, these cleavages, in addition to regulating membrane receptor levels, generate active fragments that can regulate biological processes, such as transcription or the survival/apoptosis balance. Thus, proteolytic cleavages release RTK from the membrane and extend their functions. Furthermore, the RTK proteolysis are involved in regulating cell transformation, which highlights their potential as attractive targets for therapeutic strategies. *Oncogene* (2009) 28, 2185–2195; doi:10.1038/onc.2009.88; published online 4 May 2009

Keywords: receptor tyrosine kinase; cleavages; caspase; metalloprotease; γ -secretase; signalling

RTK as a membrane mediator between the extracellular and intracellular compartments

In multicellular organisms, the dialogue between cells is crucial to harmonious development and, in adults, to tissue homeostasis. This dialogue operates notably through soluble cytokines and their cognate membrane receptors. Cytokines secreted by cells into the extracellular environment can bind with high affinity to the extracellular domains of their respective specific membrane receptors expressed on the surface of target cells. Ligand binding triggers activation of the receptor, which transmits the information from the extracellular to the intracellular compartment. Receptor tyrosine kinases (RTK) constitute a large family of information-transmitting membrane receptors. The variability of their extracellular regions results in a wide specificity range as regards cytokine ligands. Inversely, their intracellular

regions possess a conserved tyrosine kinase domain, involved in message transmission (Hubbard and Till, 2000). Ligand-activated RTK can initiate multiple biological responses, including proliferation, cell motility, survival and differentiation.

Receptor tyrosine kinases are activated through dimerization and trans-autophosphorylation of tyrosine residues. The intracellular region of an RTK then becomes a signalling platform that can recruit numerous cytoplasmic proteins through phosphorylated tyrosine residues. In turn, these signalling proteins activate signalling pathways commonly organized in a cascade, which will propagate the information inside the cell (Schlessinger, 2000). The signalling cascades are often interconnected and are able to activate or downregulate each other (Amit *et al.*, 2007). Therefore, the entire intracellular signalling mechanism is viewed as a network rather than as a superposition of multiple linear pathways.

In keeping with the involvement of RTK in controlling a wide range of biological responses, their deregulation is associated with numerous types of cancer. Uncontrolled RTK activation involves several mechanisms, including tyrosine kinase activation by mutations, generation of constitutive fusion through chromosomal translocation, and in most cases, aberrant overexpression of the RTK and/or its ligand, leading to an autocrine or paracrine activation loop (Kolibaba and Druker, 1997).

RTK are more than membrane receptors

The signalling pathways initiated by ligand-activated membrane-anchored RTK are studied extensively, the challenge being to unravel the relationship between activated signalling pathways and integrated biological responses. Yet RTK do not exist only at the cell surface; they have been observed in the extracellular environment, the cytoplasm and even in the nucleus. These unexpected locations are mostly the consequence of proteolytic cleavages. Recently, the molecular mechanisms underlying these RTK cleavages have been decrypted. In this review, we describe these recent findings, involving caspases, membrane metalloproteases and the γ -secretase complex as proteases targeting RTK. Interestingly, in addition to inactivating RTK, the proteolytic cleavages generate active fragments acting in other cell compartments. Thus, in parallel with the classical signalling cascades initiated by full-length membrane RTK, novel signalling mechanisms have emerged, in which proteolytic fragments, like emissaries, transmit information directly.

Correspondence: Dr D Tulasne, CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, B.P.447, 59021 Lille, France. E-mail: david.tulasne@ibl.fr

Received 10 June 2008; revised 23 March 2009; accepted 26 March 2009; published online 4 May 2009

RTK are reaped by caspases

Apoptotic cell death is triggered by a variety of physiological and pathological stimuli. Its characteristic morphological features include cell rounding, membrane blebbing, cytoplasmic condensation and DNA fragmentation. During apoptosis, caspases forming a family of cystein-dependent aspartate-directed proteases, can cleave a wide range of substrates contributing to the characteristic morphological modifications of apoptosis (Luthi and Martin, 2007). Caspases can also contribute to promoting cell death by inactivating survival mechanisms. They can notably cleave several RTK, which are the major mediators of the survival response.

The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), a member of the EGFR family, mediates critical survival signals, but in response to a variety of apoptotic stimuli, it is downregulated by activated caspases (Bae *et al.*, 2001; He *et al.*, 2003; Zhuang *et al.*, 2003; He *et al.*, 2006) that cleave the receptor within its C-terminal tail (Figure 1a). Interestingly, cells expressing uncleavable EGFR show slightly delayed cell death. This suggests that caspase cleavages suppress potential survival signalling through the downregulation of EGFR, identifying caspases as modulators of cell signalling (He *et al.*, 2006).

RTK are on the way to dependence

The caspase cleavages of EGFR proteins fail to generate detectable stable fragments. In contrast, caspase cleavages of the RTK RET, Met, TrkC, ALK, ErbB2 and EphA4 generate fragments acting directly on cell fate (Bordeaux *et al.*, 2000; Tikhomirov *et al.*, 2005; Benoit *et al.*, 2004; Tulasne *et al.*, 2004; Mourali *et al.*, 2006; Foveau *et al.*, 2007; Tauszig-Delamasure *et al.*, 2007; Strohecker *et al.*, 2008; Furne *et al.*, 2009). These fragments, generated by one or several cleavages, isolate the entire kinase domain of Met and RET, create a truncated kinase domain from TrkC, ALK and EphA4 or from the C-terminal truncation in ErbB2 (Figure 1a). Thus, these cleavages dissociate the extracellular ligand-binding domain from the kinase domain or the C-terminal binding site for signalling proteins, thereby potentially abolishing the receptor function. Interestingly, the cytoplasmic fragments generated from RET, Met, TrkC and ErbB2, as well as from the remaining membrane-anchored fragment of ALK and EphA4 can all promote apoptosis. Therefore, in addition to inactivating these survival receptors, the caspase cleavages convert them to proapoptotic factors (Figure 1a). In contrast, except in the case of the orphan receptor, ErbB2, ligand stimulation inhibits the caspase cleavage of these receptors, probably through inhibition of caspase activity after induction of survival responses. Thus, the proteolytic RTK fragments generated by the caspase cleavage can promote apoptosis, a response opposite to the survival signalling induced by the ligand-activated full-length receptor (Figure 1b). It is worth

noting that although ErbB2 is an orphan receptor, it is able to contribute to cell survival through its association with other EGFRs or through its overexpression in tumour cells.

The proapoptotic function mediated by these RTK in the absence of their respective ligands, contrasting with their anti-apoptotic function upon ligand stimulation, is the hallmark of the emerging family of dependence receptors. Although a receptor is usually considered inactive until bound by its ligand, these receptors have been shown to induce cell death in the absence of the ligand. Thus, expression of these receptors leads to dependence on the ligand for cell survival (Bredesen *et al.*, 2005). Very little is known about the physiological involvement of the proapoptotic fragments released from RTK. However, it has been shown that ligand-activated TrkC induces neuron survival, whereas ligand withdrawal induces apoptosis. Interestingly, caspase-uncleavable TrkC impairs apoptosis induced by ligand withdrawal, showing that this neuronal cell death is not caused only by the loss of a survival response, but also to a proapoptotic activity induced by cleaved TrkC (Tauszig-Delamasure *et al.*, 2007). EphA4 is also involved in regulating the survival/apoptosis balance in the nervous system. Indeed, EphA4-deficient mice show excessive numbers of neuroblasts in the sub-ventricular zone, whereas the absence of its ligand, the EphrinB3, results in increased cell death. Furthermore, treatment with soluble EphrinB3 into the lateral ventricle reduced cell death. Altogether, these observations support the involvement of EphA4 in neurogenesis through a dependence mechanism (Furne *et al.*, 2009). In the case of RET, cleavage by caspases has been linked to Hirschsprung's disease (an intestinal malformation characterized by the absence of parasympathetic neurons in the hindgut), as Hirschsprung's-associated RET mutations impair the ligand downregulation of RET proapoptotic activity (Bordeaux *et al.*, 2000). Thus, caspase cleavages of these three RTK are associated with the regulation of the neuronal survival/apoptosis balance, a tightly regulated process. Met and ALK are also expressed in the developing nervous system, and ligand-activated Met induces neuron survival (Allouche, 2007; Runeberg-Roos and Saarma, 2007; Maina and Klein, 1999). This raises the possibility that the proapoptotic properties showed by these receptors in the absence of the ligand might contribute to neuronal cell death during development. The future challenge will be to unravel the physiological relevance of caspase-dependent cleavage of RTK notably during development. With this aim, several laboratories are developing genetically modified mice expressing an uncleavable receptor mutated at the caspase site.

Both survival receptors and messengers of death

Although the survival signalling pathways activated upon RTK stimulation are well described, the down-

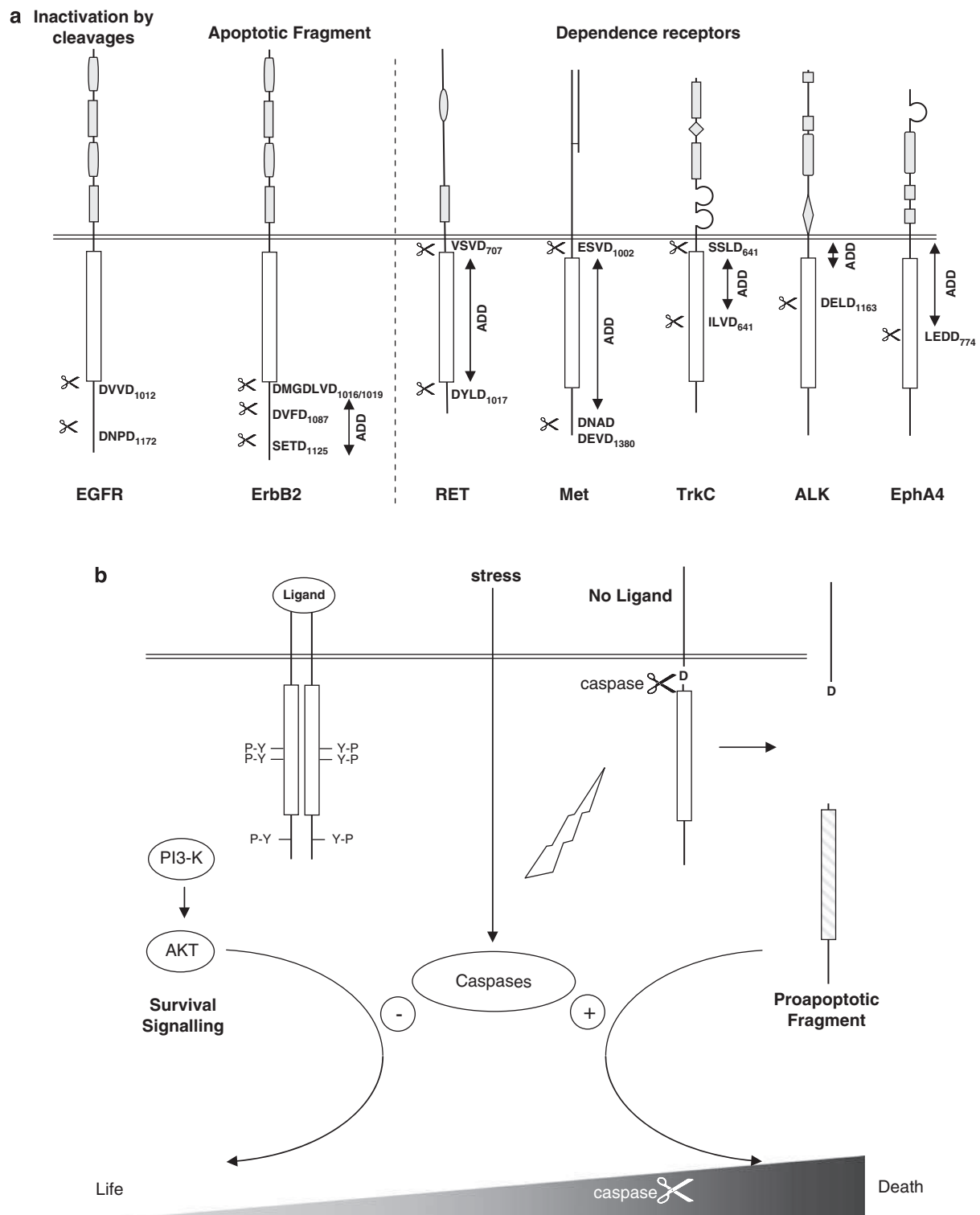


Figure 1 Receptor tyrosine kinases are targets of caspases. **(a)** The extracellular domains, the intracellular kinase domain (white box) (Hubbard and Till, 2000) and the identified caspase sites of receptor tyrosine kinase (RTK) are represented. On the left are represented the epidermal growth factor receptor (EGFR), inactivated by caspase cleavages, and the ErbB2 receptor, in which caspase cleavages generate apoptotic fragments. On the right are represented the RTK classified as dependence receptor, able to induce survival in response to their ligand and apoptosis through the generation of proapoptotic fragments. The identified addition dependence domains (ADD) involved in the proapoptotic response are indicated. **(b)** Representation of the dependence mechanism induced by RTK. In the presence of ligand (on the left), activated RTK initiates survival signalling pathways, including activation of PI3-K–AKT signalling, which counteract apoptosis notably through the inhibition of caspase activity. In contrast, in the absence of ligand (on the right), some RTK are cleaved by caspases generating proapoptotic fragment able to regulate caspase activity and to amplify cell death.

stream responses induced by RTK fragments remain poorly understood. The proapoptotic domain exposed upon caspase cleavage (named ADD for Addiction Dependence Domain in the dependence receptor family) differs among these RTK, extending through the entire kinase domain in RET and Met, being located in the N-terminal part of the kinase domain in TrkC, the N-terminal region of ErbB2 and within the juxtamembrane domain in ALK (Figure 1a). These distinct locations suggest that these RTK might not share the same cell-death-promoting mechanism.

It has been shown in pituitary cells that the proapoptotic property of RET is associated with the formation of a complex between RET, caspase-3 and PKC δ . This promotes RET cleavage, leading finally to p53 expression and apoptosis (Canibano *et al.*, 2007). In the case of ErbB2, it has been shown that the fragment generated through the caspase-dependent cleavage contains a BH3-like domain involved in its mitochondrial localization and its association with the anti-apoptotic protein, Bcl-x_L. These properties are necessary for mitochondrial cytochrome *c* release and apoptosis induced by the ErbB2 fragment (Strohecker *et al.*, 2008). Thus, these receptors are able to promote cell death through the generation of fragments acting directly on the apoptotic machinery. In the light of these signalling mechanisms, we can propose that proapoptotic fragments of RTK act directly on the apoptotic process. This contrasts with the survival response, mediated by ligand-activated membrane receptors and based on the activation of signalling cascades (Figure 1b).

Shedding releases RTK from the membrane

Cell-membrane-bound proteins can be cleaved proteolytically in the juxtamembrane region through a process called ectodomain shedding, releasing soluble extracellular domains. Ectodomain shedding is a widespread form of proteolytic processing affecting many proteins, including growth factors, cytokines, adhesion molecules, receptors and proteins of the immune system (Huovila *et al.*, 2005). Several extracellular RTK fragments have been observed in the extracellular medium. This unexpected localization is the consequence of ectodomain shedding, evidenced for at least 15 RTK (Table 1).

The shedding activity is attributed to metalloproteases such as matrix metalloproteases (MMP) and A Disintegrins And Metalloproteases (ADAM) or to aspartic proteases (BACE). Among them, the ADAM proteins seem to be responsible for the majority of RTK shedding. Notable in this respect is ADAM17, initially identified as TNF- α -converting enzyme. It has been shown that ADAM17 cleaves CSFR, VEGFR2, ErbB4 and c-Kit, whereas EphB2 is processed by ADAM10 (Table 1). In addition, it has been shown that multiple sheddases can cleave the same substrate. Accordingly, we have shown that silencing of ADAM17 inhibits only partial shedding from Met, suggesting that other

metalloproteases could process Met (Foveau *et al.*, 2009). Moreover, it has recently been shown in NIH3T3 cells that shedding from Met involves ADAM10 (Kopitz *et al.*, 2007). Thus, shedding from RTK could involve several metalloproteases, which could be engaged differently according to the cell type or the stimulus. However, for several RTK the proteases responsible for shedding are not yet known.

Shedding involving ADAM proteins can occur constitutively or in response to different stimuli, such as treatment with phorbol esters (PMA, phorbol myristate acetate), PKC activation, growth factor or cytokine stimulation and calcium influx (Blobel, 2005) (Table 1). In addition, shedding can be activated upon ligand stimulation, as evidenced for EGFR, CSFR, TrkA, and VEGFR (Table 1). Different stimuli can activate shedding of the same RTK. For instance, Met shedding is reported to be induced by PMA (Crepaldi *et al.*, 1994; Jeffers *et al.*, 1997), suramin (Galvani *et al.*, 1995), EGF and LPA (lysophosphatidic acid), HGF/SF (Wajih *et al.*, 2002), or by an antibody directed against the extracellular domain of Met (DN30) (Petrelli *et al.*, 2006). Although numerous stimuli are known to be involved in the modulation of shedding, the underlying mechanisms are poorly understood. However, it has been recently shown that mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways are involved in activating ADAM-mediated ectodomain shedding, as VEGF enhances ADAM17-mediated VEGFR2 shedding through the involvement of MAPK Erk and p38 and PKC, thereby also triggering shedding from other ADAM17 substrates (Swendeman *et al.*, 2008).

This proteolysis occurs within the extracellular juxtamembrane domain of the receptor, releasing the extracellular ligand-binding domain into the medium and generating cell-bound fragments. ADAM-mediated ectodomain shedding from cell adhesion molecules has been implicated in cell-cell interactions and in cell migration (Toussey *et al.*, 2006). For growth factors or cytokines, the main consequence of ectodomain shedding is to allow a membrane-anchored growth factor or cytokine (such as TNF- α or an EGFR ligand) to participate in paracrine signalling (Blobel, 2005).

Although the biological involvement of RTK ectodomain shedding is less understood, this cleavage may play several roles in the regulation of RTK signalling. First, ectodomain shedding is involved in the downmodulation of RTK, as PMA- or ligand-stimulation-induced shedding from several RTK, such as CSF-1R (Downing *et al.*, 1989), c-Kit (Yee *et al.*, 1994) and TrkA (Diaz-Rodriguez *et al.*, 1999) leads to their downregulation through a decrease in cell surface receptor. This downregulation might have functional consequences on RTK signalling, as PMA-induced shedding from TrkA prevents its ligand-induced autophosphorylation (Cabrera *et al.*, 1996; Diaz-Rodriguez *et al.*, 1999).

In addition, the released extracellular domains might act as decoys associating with the ligand, which would then be unavailable for the full-length membrane-bound receptor (Figure 2). This potential decoy function is supported by the ability of some extracellular fragments

Table 1 Shedding and γ -secretase cleavages of RTK

	<i>Shedding</i>	<i>References</i>	<i>γ-Secretase cleavage</i>	<i>References</i>
CSFR	Shed by ADAM17 Enhanced by CSF, PMA, IL2-4 Downregulation of CSFR in response to PMA	(Rovida <i>et al.</i> , 2001; Wilhelmsen and van der Geer, 2004)	Downregulation of CSFR Nuclear localization of CSFR-ICD	(Kasuga <i>et al.</i> , 2007)
c-Met	Involvement of ADAM17 Enhanced by PMA, EGF, LPA, suramin, DN30 antibody, HGF MET-NTF potential decoy	(Prat <i>et al.</i> , 1991; Galvani <i>et al.</i> , 1995; Jeffers <i>et al.</i> , 1997; Nath <i>et al.</i> , 2001; Wajih <i>et al.</i> , 2002; Athauda <i>et al.</i> , 2006; Petrelli <i>et al.</i> , 2006)	Ligand-independent down-regulation Nuclear localization of MET-ICD	(Foveau <i>et al.</i> , 2009)
Tie1 receptor	Enhanced by PMA, VEGF, TNF- α , shear stress, inflammatory cytokines Modulates ligand responsiveness of associated receptor Tie2	(Yabkowitz <i>et al.</i> , 1997, 1999; McCarthy <i>et al.</i> , 1999; Chen-Konak <i>et al.</i> , 2003; Marron <i>et al.</i> , 2007)	Prevent accumulation of deleterious phosphorylated Tie1-ICD	(Marron <i>et al.</i> , 2007)
IGF-IR EphB2	Induced by PKC Shed by ADAM10 in response to ligand Enhanced by EphrinB, calcium influx, <i>N</i> -methyl-D-aspartic acid	(McElroy <i>et al.</i> , 2007) (Litterst <i>et al.</i> , 2007)	Labile IGF-IR-ICD Ligand-dependent downregulation	(McElroy <i>et al.</i> , 2007) (Litterst <i>et al.</i> , 2007)
ErbB4	Shed by ADAM17 Enhanced by neuregulins, PMA, pervanadate	(Vecchi <i>et al.</i> , 1996, 1998; Vecchi and Carpenter, 1997; Rio <i>et al.</i> , 2000)	ErbB4-ICD regulates transcriptional responses; induced apoptosis	(Linggi and Carpenter, 2006; Ni <i>et al.</i> , 2001; Sardi <i>et al.</i> , 2006; Williams <i>et al.</i> , 2004)
Ryk			Nuclear localization of Ryk-ICD, enhanced by Wnt3 involved in neuronal differentiation	(Lyu <i>et al.</i> , 2008)
TrkA	Enhanced by PMA, NGF TrkA-CTF active fragment, induces neurite outgrowth	(Cabrera <i>et al.</i> , 1996; Diaz-Rodriguez <i>et al.</i> , 1999)		
Non catalytic TrkCNC2 c-Kit	Enhanced by PMA, NT3 Shed by ADAM17 Enhanced by PMA Kit-CTF potential decoy	(Mateos <i>et al.</i> , 2003) (Lev <i>et al.</i> , 1992; Yee <i>et al.</i> , 1993; Turner <i>et al.</i> , 1995; Dahlen <i>et al.</i> , 2001; Cruz <i>et al.</i> , 2004)		
ErbB2	Shed by ADAM10 Enhanced by PMA, pervanadate, toremifene ErbB2-NTF correlates with malignancy Inhibited by TIMP1	(Warri <i>et al.</i> , 1996; Codony-Servat <i>et al.</i> , 1999; Molina <i>et al.</i> , 2001; Nagy <i>et al.</i> , 2005; Saez <i>et al.</i> , 2006)		
DDR1 Tie 2 receptor VEGFR2	Induced by collagen Enhanced by VEGF, PMA Shed by ADAM17 Enhanced by PMA, VEGF-A, calcium ionophore ionomycin	(Slack <i>et al.</i> , 2006) (Findley <i>et al.</i> , 2007) (Swendeman <i>et al.</i> , 2008)		
EGFR	Enhanced by PMA, heat-inactivated fetal bovine serum, pervanadate and EGFR ligands (EGF and TGF- α)	(Perez-Torres <i>et al.</i> , 2008) (Sanderson <i>et al.</i> , 2008)		

Abbreviations: ADAM, A Disintegrins And Metalloproteases; EGFR, epidermal Growth factor receptor; ICD, intracellular domain; LPA, lysophosphatidic acid; NTF, N-terminal fragment; RTK, receptor tyrosine kinase.

Approximately 15 RTK are shed by metalloproteases. These cleavages involve mainly the ADAM17 and are induced by various stimuli. The extracellular NTF generated could act as a decoy fragment as evidenced for some of them. For about half of the shed RTK (upper part of the table), metalloprotease cleavage is followed by γ -secretase cleavage. This further cleavage is involved in the downregulation of RTK and in the generation of active fragment able to regulate biological functions, such as transcriptional response.

to bind their ligand efficiently, as evidenced for the extracellular fragments of c-Kit and Met (Turner *et al.*, 1995; Wajih *et al.*, 2002). Furthermore, conditioned medium containing shed Met fragments can inhibit intracellular signalling induced by ligand-activated full-length receptor (Petrelli *et al.*, 2006; Wajih *et al.*, 2002).

Alternatively, ADAM-mediated shedding from RTK can initiate signalling pathways through generation of the membrane-bound fragment. The membrane-anchored fragments generated by shedding from TrkA and ErbB2 show increased autokinase activity (Diaz-Rodriguez *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 2004). In addition, the membrane-bound fragment of TrkA can associate with signalling proteins, such as p85 PI3-K and PLC γ , suggesting that the truncated fragment is signalling-competent (Diaz-Rodriguez *et al.*, 1999). In breast cancer cells, it has been shown that heregulin stimulates phosphorylation of the membrane-anchored fragment (p95^{ErbB2}) generated by the metalloprotease-dependent cleavage of ErbB2, when heterodimerized with ErbB3; this results in the activation of downstream signalling mediators, such as Akt (Xia *et al.*, 2004).

Downregulation of RTK by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis

The role of shedding, notably in degradation, can be understood as part of a more complex process. Ectodomain shedding from several RTK by metalloprotease-dependent cleavage is also the checkpoint of another protease, the γ -secretase complex (Table 1). The γ -secretase complex cannot efficiently cleave full-length type-1 proteins, such as RTK, and initial ectodomain removal is a prerequisite to intramembrane cleavage of the remaining stub (Brown *et al.*, 2000). Detailed genetic and biochemical studies have shown that this second cleavage involves the γ -secretase complex, including APH-1, Nicastrin, Pen-2 and presenilin 1–2 as catalytic cores (De Strooper, 2003; Edbauer *et al.*, 2003; Fraering *et al.*, 2004; Parks and Curtis, 2007). This proteolytic process in two sequential steps has been named Presenilin-dependent Regulated Intramembrane Proteolysis (PS-RIP). This mechanism plays a crucial role in Alzheimer's disease, as PS-RIP of amyloid precursor protein leads to the generation of the A β fragments found in the brains of patients (Wilquet and De Strooper, 2004). Three fragments are potentially generated by PS-RIP, namely an extracellular and soluble N-terminal fragment (NTF), an intermediate membrane-anchored C-terminal fragment (CTF) and an intracellular domain (ICD) generated by further cleavage by the γ -secretase complex.

A common feature of the ICD generated from RTK is their high instability. As evidenced, for instance, for CSF-R, IGF-IR, Tie1, EphB2 and Met the ICD is rapidly degraded through a proteasome-dependent mechanism (Wilhelmsen and van der Geer, 2004; Litterst *et al.*, 2007; Marron *et al.*, 2007; McElroy *et al.*, 2007; Foveau *et al.*, 2009) (Figure 2). Moreover,

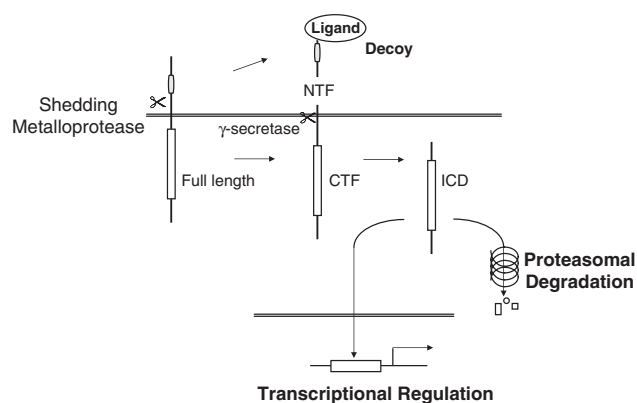


Figure 2 Presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis of receptor tyrosine kinase (RTK). Presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis (PS-RIP) of RTK is initiated by extracellular shedding within the juxtamembrane region by membrane metalloproteases. This cleavage leads to the generation of an extracellular N-terminal fragment (NTF) and a membrane-anchored C-terminal fragment (CTF). The extracellular NTF can potentially act as a decoy fragment through binding to the ligand. The CTF is cleaved in turn by the γ -secretase complex, leading to the generation of a cytoplasmic fragment (or ICD for intracellular domain). The ICD fragments are extremely labile through their proteasomal degradation, which contributes to the downregulation of RTK. In addition, some ICD show nuclear localization and regulate gene transcription.

PS-RIP shares common features with the ligand-dependent degradation described for RTK, including endocytosis and ubiquitination. For instance, processing of the EphB2 receptor is greatly stimulated by the ephrinB ligand, which stimulates ubiquitination and rapid endosomal degradation of the intracellular fragment (Litterst *et al.*, 2007). Downregulation of RTK through PS-RIP also affects the associated signalling pathways. Indeed, as recently shown in the case of the RTK, Tie1, its proteolysis by PS-RIP leads to an amplified ligand activation of the associated receptor, Tie2 (Marron *et al.*, 2007; McCarthy *et al.*, 1999; Yabkowitz *et al.*, 1999). The authors propose that release of the extracellular domain of Tie1 permits ligand access to Tie2, presumably by preventing spatial hindrance.

On the whole, PS-RIP can be considered an efficient mechanism for clearing out the membrane-anchored domains of many type-1 proteins, a function that has earned this complex the name of proteasome of the membrane (Kopan and Ilagan, 2004). Interestingly, the two steps of RTK PS-RIP, generating both a labile intracellular fragment and an extracellular soluble fragment, could participate together in downregulating receptor signalling, through both degradation of the intracellular tyrosine kinase domain and generation of an extracellular decoy inhibiting ligand activation of the remaining membrane-anchored receptor.

Both membrane receptors and transcriptional regulators

Although most PS-RIP-dependent fragments are extremely labile, some ICD are active fragments showing

physiological functions. For instance, the EGFR-family member, ErbB4, is cleaved sequentially by ADAM17 and γ -secretase complex in response to neuregulin. Unexpectedly, this proteolysis generates an ICD fragment (ErbB4-ICD) showing nuclear localization (Cheng *et al.*, 2003; Ni *et al.*, 2001). Furthermore, ErbB4-ICD is involved in regulating several biological responses triggered by ligand-activated ErbB4, according to the complex formed with different transcriptional regulators. In the lactating breast epithelium, ErbB4-ICD localizes to the nucleus with an intrinsic nuclear localization signal, promotes nuclear translocation of the transcription factor, STAT5A (signal transducer and activator of transcription 5A), and thereby activates the promoter of the β -casein-encoding gene (Williams *et al.*, 2004; Vidal *et al.*, 2005). In contrast, ErbB4-ICD acts in astrocytes as a transcriptional repressor, through the formation of a complex with the adaptor, TAB2, and the co-repressor, N-CoR, which translocates into the nucleus to repress promoters of astrocytic genes (Sardi *et al.*, 2006). Importantly, the physiological involvement of this transcriptional repression has been evidenced during embryonic development; ErbB4 knockout mice show precocious astrogenesis, a phenotype rescued by the ectopic expression of PS-RIP-sensitive ErbB4 and ErbB4-ICD in electroporated embryos. PS-RIP of ErbB4 probably contributes to the regulation of additional physiological or pathological responses, as ErbB4-ICD interacts also with Mdm2, a regulator of p53, and ETO2, a transcriptional repressor (Arasada and Carpenter, 2005; Linggi and Carpenter, 2006).

Nuclear signalling mediated by a membrane receptor fragment was initially evidenced for Notch. In response to the Notch ligand, Jagged, the generated ICD of Notch translocates into the nucleus, in which it binds transcription factors. This results in the displacement of negative co-repressors and in the transcription of Notch-responsive genes (Bray, 2006). This mechanism is the canonical signalling pathway propagating Notch-dependent responses. In contrast, RTK were believed until recently to regulate transcription solely through the activation of protein kinase cascades that ultimately phosphorylate transcription factors, regulating their activity (Schlessinger, 2000). Thus, PS-RIP might represent an alternative or parallel signalling pathway, in which generated proteolytic fragments themselves transmit information and act directly on the key regulators of transcription (Schlessinger and Lemmon, 2006). Interestingly, the PS-RIP-dependent signalling could represent the major mechanism of signal transduction for a particular RTK. The Ryk RTK is a receptor of Wnt proteins required for the differentiation of neuronal progenitor cells during cortical development. However, unlike other RTK, Ryk lacks tyrosine kinase activity leaving unresolved its mechanism to transduce signal from the cell surface to the nucleus. It has been recently shown that Ryk is processed by the PS-RIP leading to the generation of a Ryk-ICD fragment that is able to translocate into the nucleus in response to the Wnt3 stimulation. The generation of Ryk-ICD is required for Wnt3-dependent differentia-

tion of the primary culture of neuronal progenitor cells, showing that PS-RIP of Ryk represents an efficient mechanism of signalling required for neuronal determination (Lyu *et al.*, 2008). Other PS-RIP-dependent fragments of RTK have been observed in the nucleus, suggesting that the proteolytic cleavage could give these receptors the gift of ubiquity (Kasuga *et al.*, 2007; Wilhelmsen and van der Geer, 2004).

Proteolytic cleavages of RTK as gatekeepers of cell transformation

Deregulation of RTK signalling is one of the major molecular defects associated with tumourigenesis. In most cases, aberrant overexpression of an RTK and/or its ligand leads to an autocrine or paracrine activation loop. Although RTK overexpression has been attributed mainly to gene amplification or to increased transcriptional induction, aberrant RTK activation can also result from defective downregulation. For instance, deficient ligand-dependent downregulation of EGFR, Met, PDGFR, and CSFR (involving ubiquitination and lysosomal degradation) is associated with cell transformation (Bache *et al.*, 2004).

As both caspase cleavages and PS-RIP downregulate RTK expression and RTK-mediated biological responses, one might speculate that these processes could prevent tumourigenesis promoted by overexpressed RTK. In normal epithelial cells, accordingly, the PS-RIP-uncleavable Met receptor shows an extended half-life and membrane accumulation. Consequently, this receptor triggers ligand-independent biological responses, including cell migration (Foveau *et al.*, 2009).

Proteolytic cleavages can also prevent accumulation of deleterious fragments. Indeed, degradation of type I receptor by PS-RIP involves initial ectodomain shedding. However, for numerous RTK, truncation of the extracellular domain leads to the generation of active proteins often showing transforming properties. For IGFR, ErbB4 and Tiel, ectodomain shedding leads to the generation of constitutively phosphorylated membrane-tethered fragments, but their accumulation is prevented by γ -secretase cleavage and subsequent degradation of the fragment (Linggi *et al.*, 2006; Marron *et al.*, 2007; McElroy *et al.*, 2007). Thus, γ -secretase cleavage might be considered as a protective cleavage preventing the generation of transforming fragments.

In contrast, ectodomain shedding from ErbB2 is not followed by γ -secretase cleavage. Consequently, in cancer cells overexpressing ErbB2, ectodomain shedding is associated with the accumulation of membrane-anchored ErbB2-CTF fragment (or p95^{ErbB2}) (Christianson *et al.*, 1998). This fragment appears to be constitutively phosphorylated (Segatto *et al.*, 1988; Molina *et al.*, 2001) and is associated with worse outcome among patients overexpressing ErbB2 (Saez *et al.*, 2006). This suggests that ErbB2-CTF is a deleterious fragment. Furthermore, expression of the ErbB2-CTF fragment is associated with resistance to Herceptin treatment, Herceptin being a humanized

antagonist antibody directed against ErbB2 and used to treat ErbB2-overexpressing metastatic breast cancers. ErbB2-CTF is indeed potentially insensitive to this antibody targeting the extracellular region of the receptor (Scaltriti *et al.*, 2007). In consequence, ADAM inhibition is envisaged as a novel therapeutic approach to optimize the activity of other treatments, such as Herceptin or tyrosine kinase inhibitor in overexpressed ErbB2 cancers (Liu *et al.*, 2006; Witters *et al.*, 2008).

In addition to degrading RTK, proteolytic cleavages generate active fragments that might play a role in tumourigenesis. For instance, a γ -secretase fragment of ErbB4 (ErbB4-ICD), which can translocate to the nucleus to regulate gene expression, can also promote apoptosis. This conclusion rests on the observation that ErbB4-ICD appears in the cytoplasm, in which it co-localizes with mitochondria. ErbB4-ICD can interact with Bcl-2 to promote Bak-dependent permeabilization of the mitochondria and apoptosis. Interestingly, ErbB4-ICD induces efficient apoptosis in various transformed cell lines, and in human breast tumours, an association between tumour cell apoptosis and cytoplasmic localization of ErbB4-ICD has been observed (Naresh *et al.*, 2006; Vidal *et al.*, 2007). These observations suggest that PS-RIP of ErbB4 could counteract cell transformation through the generation of a proapoptotic fragment.

Deregulation of the survival/apoptosis balance in favour of survival is often associated with cell transformation. The deregulated activity of RET, TrkC, Met and ALK, four RTK classified as dependence receptors, is associated with various tumours sharing a common feature, namely constitutive tyrosine kinase activation induced by aberrant ligand expression, receptor overexpression or fusion of the kinase domain to dimerization domains (Runeberg-Roos and Saarma, 2007; Chiarle *et al.*, 2008; Migliore and Giordano, 2008). It has been established that the constitutive activation of these RTK contributes to cell transformation through the activation of signalling pathways that positively regulate survival, growth or motility. Yet one might speculate that ligand stimulation, which impairs the caspase-dependent cleavage of these receptors and thus, reduces their proapoptotic properties, might also contribute to cell transformation. According to this model, cell transformation favoured by cell survival would result from both activation of RTK-triggered positive signalling and inhibition of RTK proapoptotic properties.

From proteolysis to therapy

Receptor tyrosine kinases and their downstream signalling pathways are frequent targets of efforts to develop

anti-cancer strategies (Gschwind *et al.*, 2004). An example is the development of many antagonist antibodies, like Herceptin, directed against the RTK extracellular domain. Another attractive strategy might be to reinforce RTK proteolysis, for instance, so as to induce the degradation of an overexpressed receptor in transformed cells. In this line, an anti-Met antibody directed against the extracellular domain has been shown to downregulate expression of the receptor in Met-overexpressing cells and to hamper Met biological activity, including tumour growth in mice (Petrelli *et al.*, 2006). Interestingly, we have recently shown that this antibody reinforces Met PS-RIP, leading to Met down-regulation (Foveau *et al.*, 2009). Thus, a forced induction of PS-RIP of the RTK receptor by antagonist antibodies could be an attractive therapeutic strategy for preventing its uncontrolled activation.

Shedding from RTK generates extracellular fragments acting as decoy receptors owing to their efficient binding to the ligand (Turner *et al.*, 1995; Wajih *et al.*, 2002). Although the physiological relevance of the RTK decoy function is largely unknown, decoy approaches have been developed as therapeutic strategies. An artificial soluble extracellular domain of Met or c-Kit can efficiently inhibit relevant ligand-induced cell responses (Dahlen *et al.*, 2001; Kong-Beltran *et al.*, 2004), and a decoy Met receptor has been shown to prevent tumour growth in a mouse model (Michieli *et al.*, 2004).

The number of RTK known to be cleaved by caspases or PS-RIP has recently increased, suggesting that this type of regulation could be widespread within the family. Future challenges will be to understand relationships between canonical signalling cascades and these alternative signalling mechanisms, and to unravel the physiological relevance of fragments or truncated receptors in the multiple biological responses induced by RTK.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS, the Institut Pasteur de Lille, and INSERM, and by grants from the 'Ligue contre le Cancer, comité Nord', the 'Association pour la Recherche sur le Cancer', the 'Fondation Recherche Médicale, Comité Nord-Pas de Calais' and 'Agence Nationale de la Recherche, Young Investigator Program'. BF was supported by a 'Institut Pasteur/Région Nord-Pas de Calais' fellowship and FA and JL by grants from the French Research and Technology Minister.

References

- Allouche M. (2007). ALK is a novel dependence receptor: potential implications in development and cancer. *Cell Cycle* 6: 1533–1538.
- Amit I, Wides R, Yarden Y. (2007). Evolvable signaling networks of receptor tyrosine kinases: relevance of robustness to malignancy and to cancer therapy. *Mol Syst Biol* 3: 151.

- Arasada RR, Carpenter G. (2005). Secretase-dependent tyrosine phosphorylation of Mdm2 by the ErbB-4 intracellular domain fragment. *J Biol Chem* **280**: 30783–30787.
- Athauda G, Giubellino A, Coleman JA, Horak C, Steeg PS, Lee MJ et al. (2006). c-Met ectodomain shedding rate correlates with malignant potential. *Clin Cancer Res* **12**: 4154–4162.
- Bache KG, Slagsvold T, Stenmark H. (2004). Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer. *EMBO J* **23**: 2707–2712.
- Bae SS, Choi JH, Oh YS, Perry DK, Ryu SH, Suh PG. (2001). Proteolytic cleavage of epidermal growth factor receptor by caspases. *FEBS Lett* **491**: 16–20.
- Benoit V, Chariot A, Delacroix L, Deręgowski V, Jacobs N, Merville MP et al. (2004). Caspase-8-dependent HER-2 cleavage in response to tumor necrosis factor alpha stimulation is counteracted by nuclear factor kappaB through c-FLIP-L expression. *Cancer Res* **64**: 2684–2691.
- Blobel CP. (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 32–43.
- Bordeaux MC, Forcet C, Granger L, Corset V, Bidaud C, Billaud M et al. (2000). The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *EMBO J* **19**: 4056–4063.
- Bray SJ. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 678–689.
- Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S. (2005). Receptors that mediate cellular dependence. *Cell Death Differ* **12**: 1031–1043.
- Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**: 391–398.
- Cabrera N, Diaz-Rodriguez E, Becker E, Martin-Zanca D, Pandiella A. (1996). TrkA receptor ectodomain cleavage generates a tyrosine-phosphorylated cell-associated fragment. *J Cell Biol* **132**: 427–436.
- Canibano C, Rodriguez NL, Saez C, Tovar S, Garcia-Lavandeira M, Borrello MG et al. (2007). The dependence receptor Ret induces apoptosis in somatotrophs through a Pit-1/p53 pathway, preventing tumor growth. *EMBO J* **26**: 2015–2028.
- Chen-Konak L, Guetta-Shubin Y, Yahav H, Shay-Salit A, Zilberman M, Binah O et al. (2003). Transcriptional and post-translation regulation of the Tie1 receptor by fluid shear stress changes in vascular endothelial cells. *FASEB J* **17**: 2121–2123.
- Cheng QC, Tikhomirov O, Zhou W, Carpenter G. (2003). Ectodomain cleavage of ErbB-4: characterization of the cleavage site and m80 fragment. *J Biol Chem* **278**: 38421–38427.
- Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. (2008). The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* **8**: 11–23.
- Christianson TA, Doherty JK, Lin YJ, Ramsey EE, Holmes R, Keenan EJ et al. (1998). NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res* **58**: 5123–5129.
- Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera JC, Arribas J, Baselga J. (1999). Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res* **59**: 1196–1201.
- Crepaldi T, Prat M, Giordano S, Medico E, Comoglio PM. (1994). Generation of a truncated hepatocyte growth factor receptor in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **269**: 1750–1755.
- Cruz AC, Frank BT, Edwards ST, Dazin PF, Peschon JJ, Fang KC. (2004). Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme controls surface expression of c-Kit and survival of embryonic stem cell-derived mast cells. *J Biol Chem* **279**: 5612–5620.
- Dahlen DD, Lin NL, Liu YC, Broudy VC. (2001). Soluble Kit receptor blocks stem cell factor bioactivity in vitro. *Leuk Res* **25**: 413–421.
- De Strooper B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-secretase complex. *Neuron* **38**: 9–12.
- Diaz-Rodriguez E, Cabrera N, Esparis-Ogando A, Montero JC, Pandiella A. (1999). Cleavage of the TrkA neurotrophin receptor by multiple metalloproteases generates signalling-competent truncated forms. *Eur J Neurosci* **11**: 1421–1430.
- Downing JR, Roussel MF, Sherr CJ. (1989). Ligand and protein kinase C downmodulate the colony-stimulating factor 1 receptor by independent mechanisms. *Mol Cell Biol* **9**: 2890–2896.
- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* **5**: 486–488.
- Findley CM, Cudmore MJ, Ahmed A, Kontos CD. (2007). VEGF induces Tie2 shedding via a phosphoinositide 3-kinase/Akt dependent pathway to modulate Tie2 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**: 2619–2626.
- Foveau B, Ancot F, Leroy C, Petrelli A, Reiss K, Vingtdieux V et al. (2009). Downregulation of the Met receptor tyrosine kinase by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis. *Mol Biol Cell* **20**: 2494–2506.
- Foveau B, Leroy C, Ancot F, Deheuninck J, Ji Z, Fafeur V et al. (2007). Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ* **14**: 752–764.
- Fraering PC, Ye W, Strub JM, Dolios G, LaVoie MJ, Ostaszewski BL et al. (2004). Purification and characterization of the human gamma-secretase complex. *Biochemistry* **43**: 9774–9789.
- Furne C, Ricard J, Cabrera JR, Pays L, Bethea JR, Mehlen P et al. (2009). EphrinB3 is an anti-apoptotic ligand that inhibits the dependence receptor functions of EphA4 receptors during adult neurogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 231–238.
- Galvani AP, Cristiani C, Carpinelli P, Landonio A, Bertolero F. (1995). Suramin modulates cellular levels of hepatocyte growth factor receptor by inducing shedding of a soluble form. *Biochem Pharmacol* **50**: 959–966.
- Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**: 361–370.
- He YY, Huang JL, Chignell CF. (2006). Cleavage of epidermal growth factor receptor by caspase during apoptosis is independent of its internalization. *Oncogene* **25**: 1521–1531.
- He YY, Huang JL, Gentry JB, Chignell CF. (2003). Epidermal growth factor receptor down-regulation induced by UVA in human keratinocytes does not require the receptor kinase activity. *J Biol Chem* **278**: 42457–42465.
- Hubbard SR, Till JH. (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* **69**: 373–398.
- Huovila AP, Turner AJ, Pelto-Huikko M, Karkkainen I, Ortiz RM. (2005). Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci* **30**: 413–422.
- Jeffers M, Taylor GA, Weidner KM, Omura S, Vande-Woude GF. (1997). Degradation of the Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol* **17**: 799–808.
- Kasuga K, Kaneko H, Nishizawa M, Onodera O, Ikeuchi T. (2007). Generation of intracellular domain of insulin receptor tyrosine kinase by gamma-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* **360**: 90–96.
- Kolibaba KS, Druker BJ. (1997). Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1333**: F217–F248.
- Kong-Beltran M, Stamos J, Wickramasinghe D. (2004). The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation. *Cancer Cell* **6**: 75–84.
- Kopan R, Ilagan MX. (2004). Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 499–504.
- Kopitz C, Gerg M, Bandapalli OR, Ister D, Pennington CJ, Hauser S et al. (2007). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Res* **67**: 8615–8623.
- Lev S, Yarden Y, Givol D. (1992). A recombinant ectodomain of the receptor for the stem cell factor (SCF) retains ligand-induced receptor dimerization and antagonizes SCF-stimulated cellular responses. *J Biol Chem* **267**: 10866–10873.
- Linggi B, Carpenter G. (2006). ErbB-4 s80 intracellular domain abrogates ETO2-dependent transcriptional repression. *J Biol Chem* **281**: 25373–25380.

- Linggi B, Cheng QC, Rao AR, Carpenter G. (2006). The ErbB-4 s80 intracellular domain is a constitutively active tyrosine kinase. *Oncogene* **25**: 160–163.
- Litterst C, Georgakopoulos A, Shioi J, Ghersi E, Wisniewski T, Wang R et al. (2007). Ligand binding and calcium influx induce distinct ectodomain/gamma-secretase-processing pathways of EphB2 receptor. *J Biol Chem* **282**: 16155–16163.
- Liu X, Fridman JS, Wang Q, Caulder E, Yang G, Covington M et al. (2006). Selective inhibition of ADAM metalloproteases blocks HER-2 extracellular domain (ECD) cleavage and potentiates the anti-tumor effects of trastuzumab. *Cancer Biol Ther* **5**: 648–656.
- Luthi AU, Martin SJ. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* **14**: 641–650.
- Lyu J, Yamamoto V, Lu W. (2008). Cleavage of the Wnt receptor Ryk regulates neuronal differentiation during cortical neurogenesis. *Dev Cell* **15**: 773–780.
- Maina F, Klein R. (1999). Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nat Neurosci* **2**: 213–217.
- Marron MB, Singh H, Tahir TA, Kavumkal J, Kim HZ, Koh GY et al. (2007). Regulated proteolytic processing of Tie1 modulates ligand responsiveness of the receptor-tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem* **282**: 30509–30517.
- Mateos S, Calothy G, Lamballe F. (2003). The noncatalytic TrkCNC2 receptor is cleaved by metalloproteases upon neurotrophin-3 stimulation. *Oncogene* **22**: 740–745.
- McCarthy MJ, Burrows R, Bell SC, Christie G, Bell PR, Brindle NP. (1999). Potential roles of metalloprotease mediated ectodomain cleavage in signaling by the endothelial receptor tyrosine kinase Tie-1. *Lab Invest* **79**: 889–895.
- McElroy B, Powell JC, McCarthy JV. (2007). The insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor is a substrate for gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun* **358**: 1136–1141.
- Michieli P, Mazzone M, Basilico C, Cavassa S, Sottile A, Naldini L et al. (2004). Targeting the tumor and its microenvironment by a dual-function decoy Met receptor. *Cancer Cell* **6**: 61–73.
- Migliore C, Giordano S. (2008). Molecular cancer therapy: can our expectation be MET? *Eur J Cancer* **44**: 641–651.
- Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. (2001). Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* **61**: 4744–4749.
- Mourali J, Benard A, Lourenco FC, Monnet C, Greenland C, Moog-Lutz C et al. (2006). Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose proapoptotic functions are activated by caspase cleavage. *Mol Cell Biol* **26**: 6209–6222.
- Nagy P, Friedlander E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J et al. (2005). Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* **65**: 473–482.
- Naresh A, Long W, Vidal GA, Wimley WC, Marrero L, Sartor CI et al. (2006). The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Res* **66**: 6412–6420.
- Nath D, Williamson NJ, Jarvis R, Murphy G. (2001). Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase. *J Cell Sci* **114**: 1213–1220.
- Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G. (2001). Gamma-secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* **294**: 2179–2181.
- Parks AL, Curtis D. (2007). Presenilin diversifies its portfolio. *Trends Genet* **23**: 140–150.
- Perez-Torres M, Valle BL, Maihle NJ, Negron-Vega L, Nieves-Alicea R, Cora EM. (2008). Shedding of epidermal growth factor receptor is a regulated process that occurs with overexpression in malignant cells. *Exp Cell Res* **314**: 2907–2918.
- Petrelli A, Circosta P, Granziero L, Mazzone M, Pisacane A, Fenoglio S et al. (2006). Ab-induced ectodomain shedding mediates hepatocyte growth factor receptor down-regulation and hampers biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 5090–5095.
- Prat M, Crepaldi T, Gandino L, Giordano S, Longati P, Comoglio P. (1991). C-terminal truncated forms of Met, the hepatocyte growth factor receptor. *Mol Cell Biol* **11**: 5954–5962.
- Rio C, Buxbaum JD, Peschon JJ, Corfas G. (2000). Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J Biol Chem* **275**: 10379–10387.
- Rovida E, Paccagnini A, Del Rosso M, Peschon J, Dello Sbarba P. (2001). TNF-alpha-converting enzyme cleaves the macrophage colony-stimulating factor receptor in macrophages undergoing activation. *J Immunol* **166**: 1583–1589.
- Runeberg-Roos P, Saarma M. (2007). Neurotrophic factor receptor RET: structure, cell biology, and inherited diseases. *Ann Med* **39**: 572–580.
- Saez R, Molina MA, Ramsey EE, Rojo F, Keenan EJ, Albanell J et al. (2006). p95HER-2 predicts worse outcome in patients with HER-2-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* **12**: 424–431.
- Sanderson MP, Keller S, Alonso A, Riedle S, Dempsey PJ, Altevogt P. (2008). Generation of novel, secreted epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB1) isoforms via metalloprotease-dependent ectodomain shedding and exosome secretion. *J Cell Biochem* **103**: 1783–1797.
- Sardi SP, Murtie J, Koirala S, Patten BA, Corfas G. (2006). Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain. *Cell* **127**: 185–197.
- Scaltriti M, Rojo F, Ocana A, Anido J, Guzman M, Cortes J et al. (2007). Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **99**: 628–638.
- Schlessinger J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**: 211–225.
- Schlessinger J, Lemmon MA. (2006). Nuclear signaling by receptor tyrosine kinases: the first robin of spring. *Cell* **127**: 45–48.
- Segatto O, King CR, Pierce JH, Di Fiore PP, Aaronson SA. (1988). Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene. *Mol Cell Biol* **8**: 5570–5574.
- Slack BE, Siniaia MS, Blusztajn JK. (2006). Collagen type I selectively activates ectodomain shedding of the discoidin domain receptor 1: involvement of Src tyrosine kinase. *J Cell Biochem* **98**: 672–684.
- Strohecker AM, Yehiely F, Chen F, Cryns VL. (2008). Caspase cleavage of HER-2 releases a Bad-like cell death effector. *J Biol Chem* **283**: 18269–18282.
- Swendeman S, Mendelson K, Weskamp G, Horiuchi K, Deutsch U, Scherle P et al. (2008). VEGF-A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling. *Circ Res* **103**: 916–918.
- Tauszig-Delamasure S, Yu LY, Cabrera JR, Bouzas-Rodriguez J, Mermet-Bouvier C, Guix C et al. (2007). The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 13361–13366.
- Tikhomirov O, Dikov M, Carpenter G. (2005). Identification of proteolytic fragments from ErbB-2 that induce apoptosis. *Oncogene* **24**: 3906–3913.
- Toussey T, Jorissen E, Reiss K, Hartmann D. (2006). (Make) stick and cut loose—disintegrin metalloproteases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* **78**: 24–46.
- Tulasne D, Deheuninck J, Lourenco FC, Lamballe F, Ji Z, Leroy C et al. (2004). Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. *Mol Cell Biol* **24**: 10328–10339.
- Turner AM, Bennett LG, Lin NL, Wypych J, Bartley TD, Hunt RW et al. (1995). Identification and characterization of a soluble c-kit receptor produced by human hematopoietic cell lines. *Blood* **85**: 2052–2058.
- Vecchi M, Baulida J, Carpenter G. (1996). Selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation. *J Biol Chem* **271**: 18989–18995.
- Vecchi M, Carpenter G. (1997). Constitutive proteolysis of the ErbB-4 receptor tyrosine kinase by a unique, sequential mechanism. *J Cell Biol* **139**: 995–1003.

- Vecchi M, Rudolph-Owen LA, Brown CL, Dempsey PJ, Carpenter G. (1998). Tyrosine phosphorylation and proteolysis. Pervanadate-induced, metalloprotease-dependent cleavage of the ErbB-4 receptor and amphiregulin. *J Biol Chem* **273**: 20589–20595.
- Vidal GA, Clark DE, Marrero L, Jones FE. (2007). A constitutively active ERBB4/HER4 allele with enhanced transcriptional coactivation and cell-killing activities. *Oncogene* **26**: 462–466.
- Vidal GA, Naresh A, Marrero L, Jones FE. (2005). Presenilin-dependent gamma-secretase processing regulates multiple ERBB4/HER4 activities. *J Biol Chem* **280**: 19777–19783.
- Wajih N, Walter J, Sane DC. (2002). Vascular origin of a soluble truncated form of the hepatocyte growth factor receptor (c-met). *Circ Res* **90**: 46–52.
- Warri AM, Isola JJ, Harkonen PL. (1996). Anti-oestrogen stimulation of ERBB2 ectodomain shedding from BT-474 human breast cancer cells with ERBB2 gene amplification. *Eur J Cancer* **32A**: 134–140.
- Wilhelmsen K, van der Geer P. (2004). Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced release of the colony-stimulating factor 1 receptor cytoplasmic domain into the cytosol involves two separate cleavage events. *Mol Cell Biol* **24**: 454–464.
- Williams CC, Allison JG, Vidal GA, Burow ME, Beckman BS, Marrero L *et al.* (2004). The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone. *J Cell Biol* **167**: 469–478.
- Wilquet V, De Strooper B. (2004). Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol* **14**: 582–588.
- Witters L, Scherle P, Friedman S, Fridman J, Caulder E, Newton R *et al.* (2008). Synergistic inhibition with a dual epidermal growth factor receptor/HER-2/neu tyrosine kinase inhibitor and a disintegrin and metalloprotease inhibitor. *Cancer Res* **68**: 7083–7089.
- Xia W, Liu LH, Ho P, Spector NL. (2004). Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016. *Oncogene* **23**: 646–653.
- Yabkowitz R, Meyer S, Black T, Elliott G, Merewether LA, Yamane HK. (1999). Inflammatory cytokines and vascular endothelial growth factor stimulate the release of soluble tie receptor from human endothelial cells via metalloprotease activation. *Blood* **93**: 1969–1979.
- Yabkowitz R, Meyer S, Yanagihara D, Brankow D, Staley T, Elliott G *et al.* (1997). Regulation of tie receptor expression on human endothelial cells by protein kinase C-mediated release of soluble tie. *Blood* **90**: 706–715.
- Yee NS, Hsiao CW, Serve H, Vosseller K, Besmer P. (1994). Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C. *J Biol Chem* **269**: 31991–31998.
- Yee NS, Langen H, Besmer P. (1993). Mechanism of kit ligand, phorbol ester, and calcium-induced down-regulation of c-kit receptors in mast cells. *J Biol Chem* **268**: 14189–14201.
- Zhuang S, Ouedraogo GD, Kochevar IE. (2003). Downregulation of epidermal growth factor receptor signaling by singlet oxygen through activation of caspase-3 and protein phosphatases. *Oncogene* **22**: 4413–4424.

B- Clivages de Met par les caspases

1- L'apoptose

Comme cela a été abordé dans la publication¹ (Ancot et al., 2009), le récepteur Met est capable d'influencer de façon importante la mort cellulaire par apoptose. Brièvement, le terme apoptose désigne un processus de mort cellulaire programmée observé dans diverses situations de stress (Kerr et al., 1972). L'apoptose possède des caractéristiques morphologiques précises : bourgeonnement de la surface membranaire, fragmentation du noyau, fragmentation internucléosomale de l'ADN, maintien de l'intégrité des organelles, fragmentation et dégradation de la cellule morte.

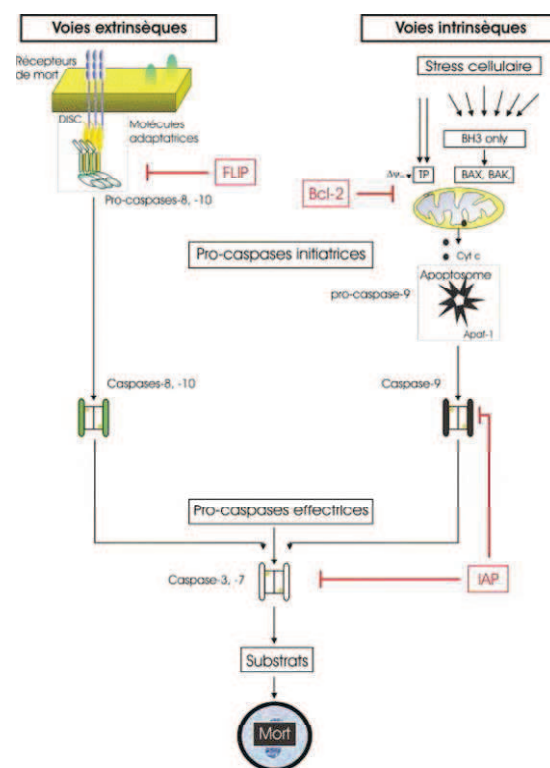


Figure 15: Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose
(Tiré de (Marchetti, 2005))

De manière générale, il existe deux types de mécanisme menant à l'apoptose: la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (voir Figure 15). La voie intrinsèque module la perméabilité de la membrane mitochondriale qui relargue alors dans le cytoplasme des facteurs pro-apoptotiques. La voie extrinsèque est initiée par des récepteurs membranaires de la superfamille du TNF tels les récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor), à TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) ou FAS. Par l'intermédiaire de différents adaptateurs, ces récepteurs activent des facteurs pro-apoptotiques. Les deux mécanismes aboutissent à

l'activation des caspases (CysteinyI ASpartate proteASE), les acteurs principaux du processus apoptotique (voir pour revue (Elmore, 2007)).

Il existe deux grands groupes de caspases : les caspases initiatrices (caspases-2, -8, -9 et -10) qui sont capables d'activer par clivage les caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7). Ces protéases clivent leurs substrats après un acide aspartique dans des motifs consensus de type DxxD. Les caspases effectrices clivent un grand nombre de protéines et permettent ainsi l'exécution du programme de mort cellulaire. Leur action peut être illustrée par l'exemple de l'inhibiteur ICAD (Inhibitor of Caspase-Activated Desoxyribonuclease). ICAD prévient la translocation de la nucléase CAD (Caspase-Activated Desoxyribonuclease) dans le noyau. Le clivage de ICAD par la caspase-3 libère la nucléase CAD active qui fragmente l'ADN, une caractéristique de l'apoptose (Enari et al., 1998).

2) Survie induite par Met et l'HGF/SF

La stimulation de Met par l'HGF/SF permet d'induire la survie d'un grand nombre de types cellulaires lorsqu'elles sont soumises à des stress variés tels que la déplétion de serum ou le rayonnement UltraViolet (U.V.). De manière générale, le couple HGF/SF-Met induit la survie par l'activation de la voie PI3K/Akt. Cette voie de signalisation permet notamment la phosphorylation et donc l'inactivation de la protéine pro-apoptotique BAD ainsi que l'expression des protéines Bcl-xl et Bcl-2 qui inhibent l'apoptose dépendante des mitochondries. D'autres protéines anti-apoptotiques sont également produites comme TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor 2), cIAP (Inhibitor of APoptosis) et MDM2 (Murin Double Minute 2), cette dernière inhibe la protéine p53 et favorise alors la survie des cellules (voir pour revue (Tulasne and Foveau, 2008)).

3) Le rôle pro-apoptotique de Met

En absence de ligand, le récepteur Met a une implication tout-à-fait différente lors de l'apoptose. En effet, notre équipe a montré que Met est clivé au niveau de l'acide aspartique 1000 dans le domaine juxtamembranaire intracellulaire. Un fragment de 40 kDa est libéré dans le cytoplasme, il correspond au domaine kinase et est nommé p40 Met. La partie extracellulaire et juxtamembranaire de Met, p100 Met, reste ancrée à la membrane (Tulasne et al., 2004) (voir Figure 16).

Le clivage de Met empêche alors toute activation potentielle par l'HGF/SF puisque le domaine de liaison au ligand est séparé du domaine kinase. Le clivage du récepteur

préviendrait donc la réponse de survie normalement induite par l'HGF/SF. D'ailleurs, ces deux mécanismes ne peuvent co-exister. En effet, en présence d'HGF/SF, la tyrosine 1001 du récepteur est phosphorylée et empêche la caspase-3 de reconnaître l'acide aspartique 1000, inhibant ainsi le clivage juxtamembranaire de Met ((Deheuninck et al., 2009) voir **Publication 5** en annexe).

Pour autant, le rôle de Met dans l'apoptose ne s'arrête pas à l'inactivation du récepteur. En effet, les fragments p100 Met et p40 Met participent à l'amplification de la mort cellulaire. Ainsi, p100 Met est encore capable d'interagir avec l'HGF/SF et sa surexpression prévient l'activation des voies de signalisation induites par Met en réponse au ligand. Le fragment p100 Met serait donc un leurre capable d'empêcher la réponse de survie induite par l'HGF/SF et de favoriser la mort cellulaire (Deheuninck et al., 2008).

Le second fragment, p40-Met, est quant à lui capable d'induire seul l'apoptose dans différents types cellulaires. De manière endogène, ce fragment est stable et contribuerait donc directement à l'amplification de la mort cellulaire (Tulasne et al., 2004). De nouvelles études sont menées afin de comprendre l'action et le rôle de p40 Met.

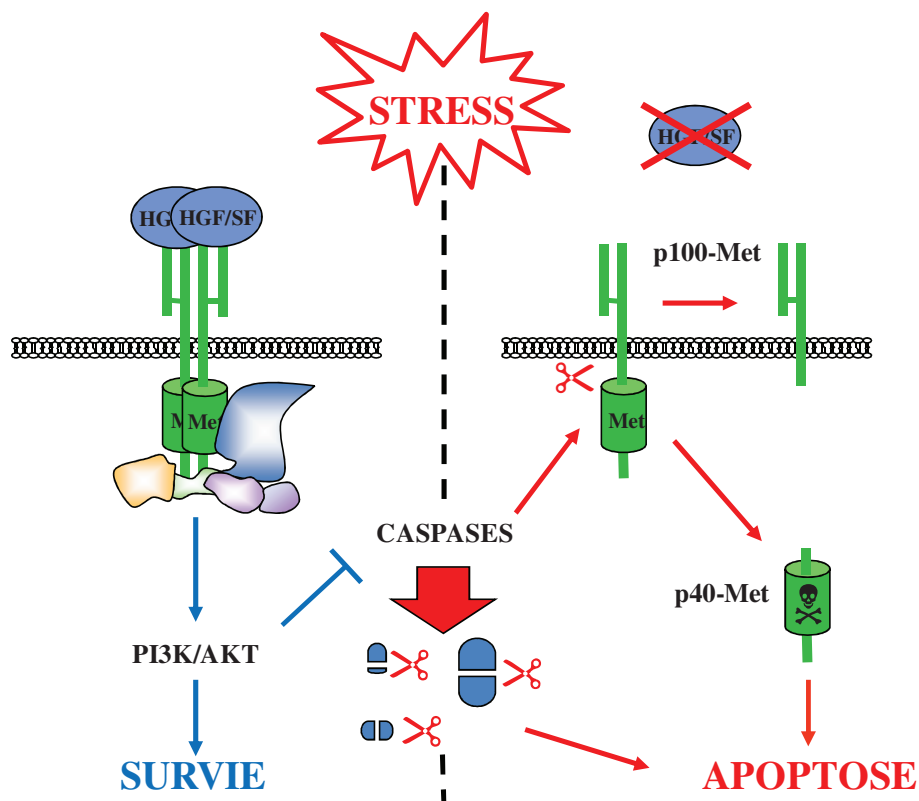


Figure 16: Fonctions de Met lors de l'apoptose

4) Les récepteurs à dépendance

L'action pro-apoptotique de Met n'est pas sans rappeler le mécanisme des récepteurs à dépendance qui induisent l'apoptose en absence de leur ligand. De la même manière que Met, ces récepteurs sont clivés par les caspases et forment des fragments pro-apoptotiques. Parmi les plus connus se trouvent p75^{NTR} (p75 NeuroTrophin Receptor), DCC (Deleted in Colorectal Cancer) ainsi que des RTK comme Ret et TrkC (voir pour revue (Goldschneider and Mehlen)). Le rôle de la dépendance au ligand a pu notamment être démontré avec le récepteur DCC et son ligand, la nétrine. En effet, lors du développement du système nerveux de la souris, le KO de la nétrine induit une diminution de neurones exprimant DCC. De plus l'expression de DCC dans le tube neural d'embryon de poulet augmente la mort cellulaire alors que celle-ci est contrecarrée par l'expression simultanée de la nétrine (Furne et al., 2008). Ainsi, DCC seul induit la mort des neurones alors qu'en présence de nétrine il induit la survie. DCC est également considéré comme un suppresseur de tumeur, 70% des cancers colorectaux ne l'expriment plus et son expression en l'absence de son ligand induit la mort cellulaire. Ces observations ont été confirmées par la surexpression de la nétrine dans les intestins; la mort cellulaire y est diminuée alors que la prédisposition aux cancers colorectaux augmente (Mazelin et al., 2004). L'ensemble de ces données illustre le rôle d'un récepteur à dépendance aussi bien dans des conditions physiologiques que pathologiques.

Ret et TrkC sont également impliqués dans le développement neuronal. Ret est même directement lié à la maladie d'Hirschsprung, une maladie où l'absence de cellules neuroganglionnaires dans la section postérieure de l'intestin peut créer une occlusion intestinale. Il avait été montré que cette mauvaise innervation pouvait être liée à des mutations du récepteur Ret sans que le mécanisme impliqué ne soit connu (Edery et al., 1994; Romeo et al., 1994). La notion de dépendance liée à Ret pourrait cependant permettre de fournir une explication. En effet, les mutations de Ret identifiées dans la maladie d'Hirschsprung inhibent la réponse de survie normalement induite par le ligand et permettent au récepteur d'induire constitutivement la mort cellulaire (Bordeaux et al., 2000). En absence ou en présence de leur ligand, les récepteurs mutés induiraient donc la mort des cellules neuroganglionnaires ce qui empêcherait la bonne innervation de l'intestin

Avec cette fonction apoptotique, une facette inédite de Met, à l'opposé des réponses biologiques qu'on lui connaissait, a été découverte. De plus, nous savons maintenant que l'absence de ligand n'est plus synonyme d'une inactivité du récepteur et cela implique de revoir le rôle de Met dans un contexte où l'HGF/SF n'est pas présent.

C- Elagage du récepteur Met

1) Caractéristiques de l'élagage

Nous avons déjà largement abordé le thème de l'élagage dans la publication 1 (Ancot et al., 2009), nous en faisons ici un court rappel afin d'introduire celui de Met. De nombreuses protéines transmembranaires sont clivées en extracellulaire aux abords de la membrane par élagage (en anglais « shedding »). L'élagage génère alors un fragment N-terminal (« N-Terminal Fragment », NTF) libéré dans le milieu extracellulaire et un deuxième fragment C-terminal (« C-Terminal Fragment », CTF) ancré à la membrane. Deux familles de protéases sont capables d'élager les protéines transmembranaires : les MMP (Matrix MetalloProteinase) et les ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase). Les différentes MMP peuvent être membranaires ou extracellulaires tandis que les ADAM sont exclusivement membranaires. L'activité enzymatique de toutes ces protéases est dépendante du zinc. L'élagage effectué par ces protéines peut être constitutif ou activé par différents inducteurs comme les esters de phorbol qui activent les PKC, des facteurs de croissance ou le stress cellulaire. Les cibles des MMP et des ADAM sont variées, ils comprennent des récepteurs, des facteurs de croissance et des molécules d'adhésion.

La diversité de substrats de l'élagage implique également une diversité de fonctions. Ainsi, ce clivage permet aux molécules d'adhésion de diminuer les interactions entre les cellules et la matrice ainsi que de libérer des facteurs de migration (Sternlicht and Werb, 2001). Il a également été montré que l'élagage convertit des facteurs de croissance ancrés à la membrane en facteurs diffusibles qui permettent l'activation de récepteurs. Le ou plutôt les exemples les plus représentatifs en sont les 7 ligands de l'EGFR. Tous sont exprimés sous forme de précurseurs ancrés à la membrane et l'élagage permet de les libérer dans le milieu extracellulaire afin d'activer leur récepteur (Blobel, 2005). Inversement, l'élagage de certains récepteurs pourrait diminuer leur activation comme c'est le cas pour le récepteur au TNF α . En présence de son ligand, le récepteur au TNF α est élagué, les cellules y sont alors moins

sensibles. Il a également été proposé que le domaine extracellulaire libéré soit susceptible d'agir en tant que leurre capable d'interagir avec le ligand (Van Zee et al., 1992).

L'élagage, en plus de libérer des fragments N-terminaux actifs dans le milieu extracellulaire, est la première étape d'un mécanisme appelé PS-RIP (PreSenilin-Regulated Intramembrane Proteolysis) (Voir Figure 17). Ainsi, le fragment C-terminal (CTF) encore ancré à la membrane, peut être pris en charge par le complexe γ -secrétase dont la sous-unité catalytique est la préséniline. Ce double clivage successif libère un domaine intracellulaire (ICD) dans le cytoplasme. L'ICD peut alors agir en tant que facteur de transcription après sa translocation dans le noyau ou être rapidement dégradé par le protéasome (Ancot et al., 2009). L'élagage, ainsi que le PS-RIP, sont donc des mécanismes protéolytiques complexes permettant de réguler l'action de nombreuses protéines membranaires et ont un impact direct lors de nombreux processus physiologiques.

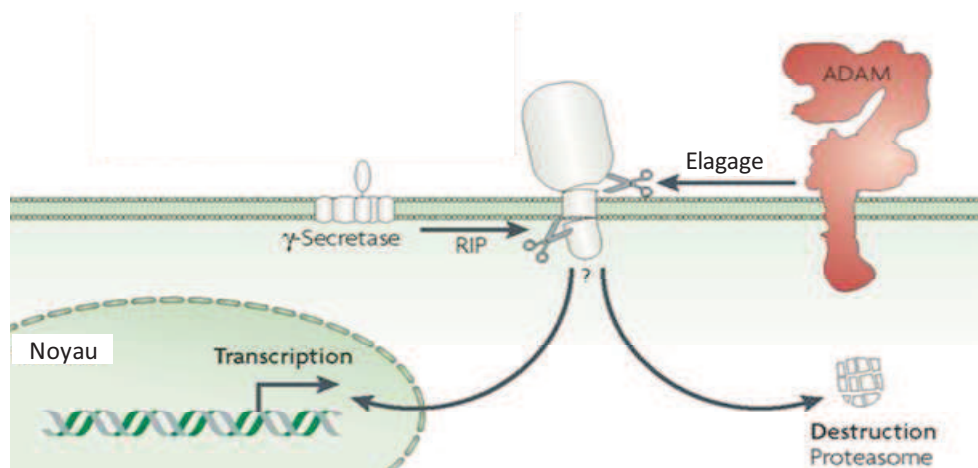


Figure 17: Mécanisme du PS-RIP
(Tiré de (Murphy, 2008))

2) L'élagage libère le domaine extracellulaire de Met

Jusqu'en 1991, le lien entre Met et l'HGF/SF n'est pas encore établi, les études sur le récepteur sont donc réalisées en absence de ligand. Dans ces conditions, Met n'a pas encore de fonction biologique connue et a une durée de demi-vie d'approximativement 5 heures (Giordano et al., 1989). Le mécanisme de sa dégradation en absence de ligand n'est pas connu mais il pourrait être lié à un clivage constitutif. En effet, il a été montré que le récepteur est clivé dans sa région extracellulaire dans une zone proche de la membrane. La partie extracellulaire de la chaîne β et le domaine α entier sont alors libérés dans le milieu. Le fragment intracellulaire de Met, quant à lui, n'est pas retrouvé dans la cellule. L'hypothèse la

plus probable est que ce fragment n'est pas stable et qu'il est rapidement dégradé (Prat et al., 1991). Ce n'est que deux ans plus tard que ce mécanisme de clivage, documenté pour de nombreuses autres protéines, est appelé élagage (Massague and Pandiella, 1993). Durant cette période, la découverte du lien entre l'HGF/SF et Met semble avoir réorienté les recherches vers les mécanismes et les fonctions du couple. Les études sur le clivage constitutif de Met se sont alors interrompues et seuls quelques travaux ont été entrepris sur l'élagage du récepteur.

Ainsi, des inducteurs de l'élagage de Met ont été identifiés comme les esters de phorbol, la suramine (un inhibiteur non-spécifique des RTK), l'EGF ou le LPA (LysoPhosphatidic Acid, un inducteur de récepteur couplé aux protéines G) (Galvani et al., 1995 ; Nath et al., 2001; Xu and Yu, 2007). Il a été montré que l'élagage de Met induit par l'EGF et le LPA nécessite l'activation de l'EGFR et de la voie MAPKinase. La signalisation de l'EGFR favorise donc la dégradation du récepteur Met. Cette dégradation, comme celle induite par les esters de phorbol et la suramine, diminuerait donc la réponse de Met à l'HGF/SF. Ces différentes études ont donc mis en évidence que l'élagage de Met a des origines diverses mais les mécanismes et les fonctions de ce clivage restent à élucider.

Nous avons évoqué précédemment l'utilisation de l'anticorps DN30, un outil pharmacologique capable de dégrader Met. Il a été démontré que le DN30 induit en fait l'élagage du récepteur et les fragments N-terminaux sont relargués dans le milieu extracellulaire (Petrelli et al., 2006). De manière intéressante, ces fragments N-terminaux sont également capables de fixer l'HGF/SF et de l'empêcher d'interagir avec le récepteur pleine longueur. Le DN30 permet donc à la fois de dégrader le récepteur et de leurrer l'HGF/SF, ce qui explique son efficacité dans l'inhibition de la croissance tumorale et la formation de métastases de tumeurs issues de xénogreffes chez la souris. La compréhension de l'élagage est donc une piste à suivre pour inhiber l'action tumorigène de Met.

L'étude du rôle du récepteur Met en absence de son ligand est un territoire encore peu exploré. Mon travail de thèse a consisté à étudier les clivages protéolytiques du récepteur. En condition apoptotique, j'ai étudié le rôle des clivages caspases sur les fonctions du récepteur. J'ai également montré que l'élagage est impliqué dans la dégradation de Met en absence de ligand et qu'il prévient notamment une activation aberrante du récepteur.

RESULTATS

I- Rôles du clivage C-terminal de Met par les caspases

A- Contexte de l'étude

L'étude sur la fonction proapoptotique de Met a débuté quelques années avant mon arrivée au laboratoire (Tulasne et al., 2004). Des constructions chimériques Trk-Met avaient été utilisées, comprenant la partie extracellulaire du RTK TrkA dont le ligand est le Nerve Growth Factor (NGF), fusionnée aux domaines transmembranaire et intracellulaire de Met (Weidner et al., 1993). Comme le récepteur Met pleine longueur, la forme Trk-Met sauvage permettait la génération du fragment proapoptotique p40 Met par le biais d'un clivage par la caspase 3.

Par la suite, d'autres constructions ont été créées afin d'exprimer un TRK-Met étiqueté avec l'épitope V5 en C-terminal. L'étiquetage de la chimère par l'épitope V5 devait faciliter l'étude du fragment p40 Met en améliorant sa détection et son immunoprécipitation. Cependant, en utilisant un anticorps dirigé contre l'épitope V5, il n'a été observé que la chimère pleine longueur et pas le fragment p40 Met. Pourtant, une réhybridation avec un anticorps dirigé contre le domaine kinase du récepteur avait permis la détection de ce fragment. L'hypothèse émise a alors été que Met était clivé une seconde fois et libérait l'épitope V5.

B- Résumé de la publication 2 et l'étude du clivage C-terminal de Met endogène

Afin de s'assurer que Met était clivé une seconde fois, la séquence du récepteur a tout d'abord été analysée ce qui a révélé un site potentiel de clivage par les caspase dans l'extrémité C-terminale du récepteur (DNID₁₃₇₄ chez la souris). En mutant l'acide aspartique 1374 en asparagine (D1374N), le clivage a été inhibé ce qui confirme l'existence d'un clivage C-terminal de Met par les caspases (Fig.1). En clivage *in vitro*, tout comme le site juxtamembranaire, le site C-terminal semble sensible à l'action de la caspase-3 (Fig.4). De manière intéressante, la comparaison entre le récepteur sauvage et muté sur le site du clivage C-terminal (D1374N) lors de l'apoptose montre une diminution importante du fragment p40 Met dans les cellules exprimant le récepteur muté (Fig. 2 et 3). Ce résultat démontre que le clivage C-terminal est important pour que le clivage juxtamembranaire et la génération de p40 Met se déroulent de façon optimale.

Il a également été montré que la présence de l'extrémité C-terminale diminue la fonction apoptotique du fragment p40 Met ce qui suggère la présence d'un domaine inhibiteur (Fig.6). Afin d'évaluer le rôle du clivage C-terminal dans la réponse apoptotique, les cellules exprimant le récepteur Trk-Met sauvage ou Trk-Met D1374N ont été comparées. En condition de stress modéré, l'absence de p40 Met a été confirmée dans les cellules exprimant Trk-Met D1374N. De plus, il a été observé une diminution de la mort cellulaire par rapport aux cellules exprimant le récepteur sauvage (Fig.7). Le clivage C-terminal de Met semble donc amplifier la mort cellulaire en favorisant la génération de p40 Met. L'ensemble des données sur le clivage C-terminal de Met ont fait l'objet d'une publication (voir **Publication 2**).

C'est lors de ces travaux qu'a débuté mon étude sur le clivage C-terminal de Met. L'utilisation de constructions de récepteurs Trk-Met et de fragments p40 Met a montré que le clivage C-terminal influe sur l'apoptose. Cependant, contrairement au fragment p40 Met, le clivage C-terminal n'avait pas été observé sur le récepteur endogène. Mon travail a donc été dans un premier temps d'élaborer une stratégie pour y parvenir.

Le principal problème était que le clivage C-terminal endogène ne libèrait qu'une courte séquence d'acides aminés (5 aa chez la souris et 10 aa chez le chimpanzé et l'humain, voir Fig.1). La diminution de la taille du récepteur est de fait très faible et ne permet pas de distinguer un Met écourté. J'ai alors pensé utiliser un anticorps spécifiquement dirigé contre l'extrémité C-terminale de Met. Cependant, les laboratoires contactés ne m'ont pas divulgué les séquences des épitopes permettant l'élaboration des anticorps commerciaux dirigés contre la partie C-terminale de Met. J'ai alors testé ces anticorps en espérant trouver celui capable de reconnaître spécifiquement l'extrémité C-terminale clivée lors du clivage par les caspases. Cette condition *sine qua none* a finalement été remplie par l'un de ces anticorps. En effet, l'anticorps C-12 (*Santa Cruz Biotechnology*) a permis de détecter le récepteur pleine longueur et non le récepteur dépourvu de l'extrémité C-terminale (voir les données supplémentaires S3). L'utilisation de cet anticorps en Western Blot, en comparaison avec un autre anticorps capable de reconnaître le domaine kinase, m'a permis de distinguer le récepteur Met pleine longueur du récepteur écourté. Ce premier objectif atteint, j'ai voulu confirmer que le clivage C-terminal favorisait le clivage juxtamembranaire et donc s'il existait une séquentialité dans les clivages du récepteur. Ainsi, grâce à une cinétique d'apoptose, j'ai pu mettre en évidence que le clivage C-terminal précède le clivage juxtamembranaire. Le clivage C-terminal a lieu dès le début de l'apoptose et, au cours de ce processus, le récepteur écourté devient la forme majoritaire du récepteur Met (Fig.5). Ces données sur le clivage C-terminal endogène ont été

insérées dans la **Publication 2**. A la suite de ces résultats, j'ai cherché à connaître les fonctions du récepteur Met écourté pendant l'apoptose.

Publication 2 : Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the Met tyrosine kinase receptor.

Foveau B, Leroy C, Ancot F, Deheuninck J, Ji Z, Fafeur V, Tulasne D.
Cell Death Differ. 2007 Apr;14(4):752-64. Epub 2006 Dec 22.

Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor

B Foveau^{1,2}, C Leroy^{1,2}, F Ancot¹, J Deheuninck¹, Z Ji¹, V Fafeur¹ and D Tulasne^{*1}

Activation of the MET tyrosine kinase receptor by hepatocyte growth factor/scatter factor is classically associated with cell survival. Nonetheless, stress stimuli can lead to a caspase-dependent cleavage of MET within its juxtamembrane region, which generate a proapoptotic 40 kDa fragment (p40 MET). We report here that p40 MET is in fact generated through an additional caspase cleavage of MET within its extreme C-terminal region, which removes only few amino acids. We evidenced a hierarchical organization of these cleavages, with the C-terminal cleavage favoring the juxtamembrane one. As a functional consequence, the removal of the last amino acids of p40 MET increases its apoptotic capacity. Finally, cells expressing a MET receptor mutated at the C-terminal caspase site are unable to generate p40 MET and are resistant to apoptosis, indicating that generation of p40 MET amplifies apoptosis. These results revealed a two-step caspase cleavage of MET resulting in the reshaping of this survival receptor to a proapoptotic factor.

Cell Death and Differentiation (2007) 14, 752–764. doi:10.1038/sj.cdd.4402080; published online 22 December 2006

The hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is a pleiotropic growth factor that acts through the MET tyrosine kinase receptor in a variety of cell types.^{1–3} Upon HGF/SF binding, the MET receptor is dimerized and its tyrosine kinase activity stimulated with autophosphorylation of the receptor.⁴ Two phospho-tyrosine residues located in the C-terminal tail of the receptor have been identified as multifunctional docking site, able to interact with several cytoplasmic signal transducers.^{5,6} Recruitment through these tyrosine residues play a crucial role in mediating biological responses to HGF/SF.⁷ In contrast to the positive signaling triggered by the C-terminal tail, the juxtamembrane region is endowed with several negative regulatory sites, which are involved in recycling and/or degradation of the receptor.^{8–12}

The ligand-activated MET stimulates proliferation, scattering, invasion and morphogenesis of epithelial cells, acts as an angiogenic factor and has chemoattractant and neurotrophic activities. HGF/SF is also a survival factor, which protects a number of cell types against cell toxicity and apoptosis.^{13–15} Phenotypic analysis of *hgf* or *met* null mice have shown that HGF/SF-MET signaling is essential for hepatocyte survival, as these mice display a severe size reduction of the liver and show massive apoptosis.^{16–18}

We recently reported that MET is a functional target of caspases.¹⁹ Indeed, we have shown that stress stimuli induce the caspase cleavage of MET at aspartic residue 1000 within the ESVD motif of the juxtamembrane region of mouse MET. This cleavage generates an intracellular 40 kDa fragment

containing the kinase domain. The p40 MET fragment itself causes apoptosis, whereas its kinase dead version is impaired in proapoptotic activity.

Activation of caspases during apoptosis results in proteolytic cleavage of a variety of substrates, which may directly contribute to the apoptotic process. In most cases, the cleavage inactivates the targeted substrate.²⁰ For instance, inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) is inactivated by caspase-3 cleavage, which allows activation of the caspase-activated DNase (CAD) and DNA fragmentation characteristic of apoptosis.^{21,22} Nonetheless, in some cases, caspase cleavage was found to activate the targeted substrate. For instance, cleavage of the serine/threonine kinase Rho-associated kinase 1 increases its kinase activity, leading to phosphorylation of the myosin light chain and membrane blebbing characteristic of apoptosis.^{23,24} The caspase cleavage in the juxtamembrane domain of MET leads to the generation of a proapoptotic factor, whereas the ligand-activated receptor induces survival. Thus, in the case of MET, caspase cleavage induces an original conversion from a survival receptor to a proapoptotic factor. The mechanisms of this conversion through caspase cleavage were unknown. We show here that in addition to the juxtamembrane cleavage, the MET tyrosine kinase is cleaved by caspases within its C-terminal extremity. By characterizing this cleavage site, we found that this additional cleavage is essential for triggering proapoptotic activity of the p40 MET fragment.

¹CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, CNRS-Institut Pasteur de Lille-Université de Lille 1-Université de Lille 2, Lille cedex, France

*Corresponding author: D Tulasne, CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, BP447, 59021 Lille, France. Tel: +33 3 20 87 10 91; Fax: +33 3 20 87 11 11; E-mail: david.tulasne@ibl.fr

²These authors contributed equally to this work.

Keywords: c-MET; tyrosine kinase receptor; hepatocyte growth factor; apoptosis; caspase

Abbreviations: HGF/SF, hepatocyte growth factor/scatter factor; NGF, nerve growth factor; TNF, tumor necrosis factor; CAD, caspase-activated DNase; ICAD, inhibitor of caspase-activated DNase; ROCK1, Rho-associated kinase 1; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ERK, extracellular-regulated kinase; RasGAP, Ras GTPase-activating protein; CBL, Casitas b-lineage lymphoma; PDGF- β -R, platelet-derived growth factor beta receptor; zVAD-FMK, Z-Val-Ala-Asp (OMe)-fluoromethyl ketone; MDCK, Madin–Darby Canine Kidney; HEK293, human embryonic renal epithelial cell 293; HeLa cells, human epithelial cells from cervical carcinoma; FCS, fetal calf serum; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

Received 15.2.06; revised 27.10.06; accepted 10.11.06; Edited by SJ Martin; published online 22.12.06

Results

Stress induces both juxtamembrane and C-terminal cleavages of MET. TRK-MET receptors are known to mediate MET-specific signals in epithelial cells in response to nerve growth factor (NGF).^{25,26} These chimeras consist of the extracellular portion of TRK-A coupled to the trans-

membrane and intracellular domains of MET. In order to facilitate its detection, we tagged TRK-MET with C-terminal V5 epitope.

The TRK-MET V5 expression plasmid was stably transfected in Madin–Darby Canine Kidney (MDCK) epithelial cells. The chimeric receptor was detected at the expected size using an anti-murine MET antibody (Figure 1a and b, left

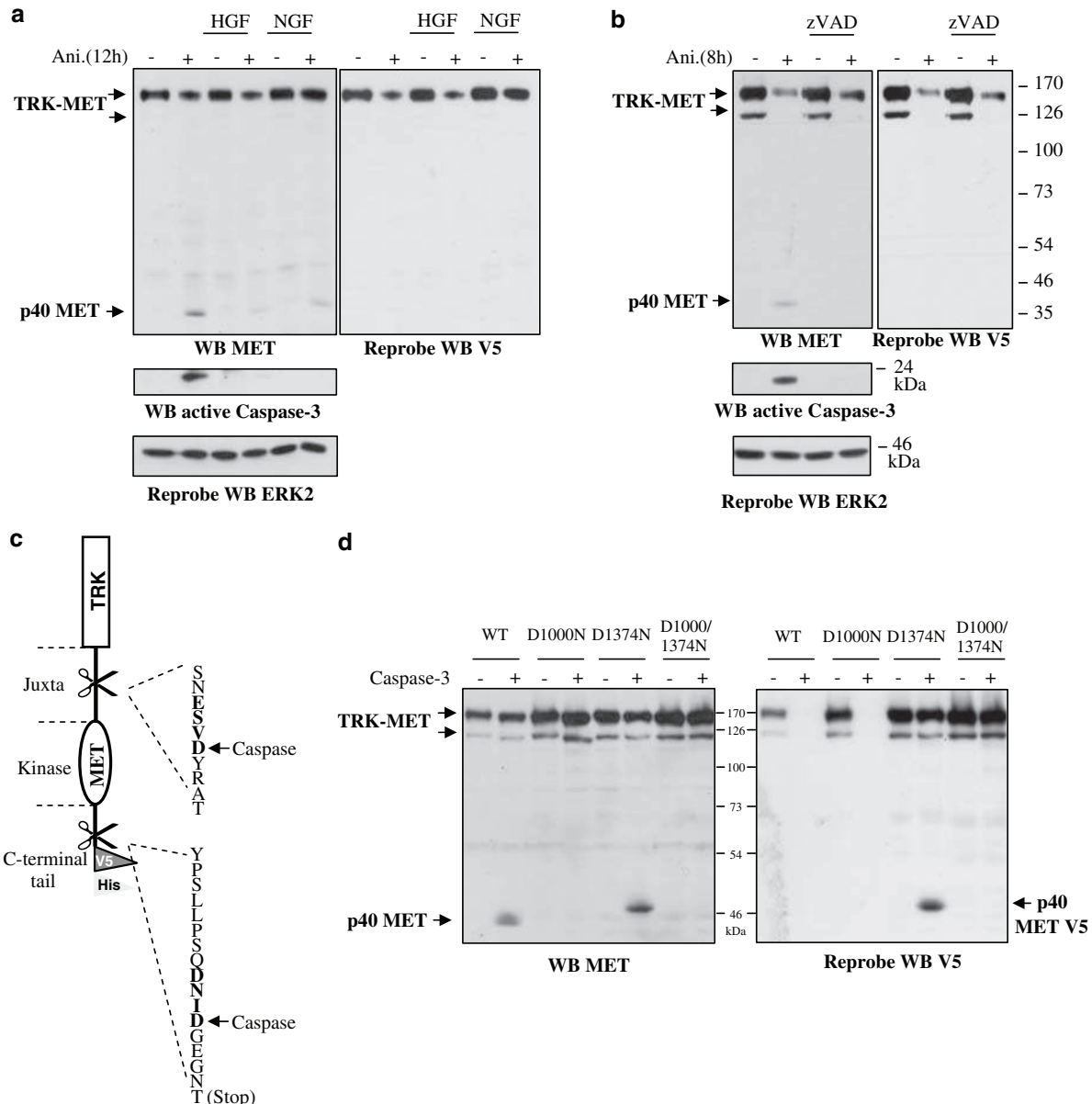


Figure 1 Tagged version of TRK-MET reveals C-terminal caspase cleavage. **(a)** MDCK epithelial cells, stably transfected with the TRK-MET V5 WT chimera, were pretreated or not for 1 h with HGF/SF (10 ng/ml) or NGF (100 ng/ml) and then treated or not for 12 h with anisomycin (Ani., 50 μ M). **(b)** MDCK epithelial cells, stably transfected with the TRK-MET V5 WT chimera, were treated for 8 h with anisomycin (Ani., 50 μ M), in the presence or absence of zVAD-FMK (zVAD, 20 μ M). **(a, b)** For each condition, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western-blotting using an antibody directed against mouse MET (top panel). The membrane was stripped and reprobed sequentially using an anti-V5 antibody (right panel) and an anti-ERK2 antibody to assess comparable loading (lower panel). Lower part of the filter was analyzed by Western blotting using an anti-active caspase-3 antibody (middle panel). Arrows indicate positions of the p150 TRK-MET (fully glycosylated), p125 TRK-MET (partially glycosylated) and p40 MET fragment. **(c)** Schematic representation of the TRK-MET V5-His receptor with murine sequences of the juxtamembrane caspase site and putative C-terminal caspase site. **(d)** Cell extracts of MDCK, stably transfected with the TRK-MET V5 WT, D1000N, D1374N, D1000/1374N, were incubated with purified caspase-3. Samples were then resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using an anti-mouse MET antibody (left panel). The filter was stripped and reprobed using an anti-V5 antibody (right panel). Arrows indicate positions of the p150 TRK-MET, p125 TRK-MET, p40 MET fragment and p40 MET-V5 fragment

panel). TRK-MET detection was similarly obtained using an anti-V5 antibody (Figure 1a and b, right panel). Treatment of these cells with the apoptotic inducer anisomycin causes within several hours activation of caspase-3 and generation of p40 MET (Figure 1a).

According to the anti-apoptotic property of the endogenous-activated MET receptor, HGF/SF stimulation induced survival of MDCK cells, accompanied by decrease of caspase-3 activation and p40 MET generation (Figure 1a). Similar effects were obtained with NGF in MDCK cells stably transfected by TRK-MET, confirming the functional activation of the chimera (Figure 1a). In addition, treatment with the pan caspase inhibitor zVAD inhibited both caspase-3 activation and p40 MET generation (Figure 1b).

Although these data were expected, the V5 antibody was not able to detect the generated p40 MET (Figure 1a and b), suggesting that the C-terminal tag was lost by cleavage during apoptosis. This led us to examine further the possible existence of a C-terminal caspase-dependent cleavage of MET.

C-terminal cleavage occurs at aspartic acid 1374. As mouse MET contains a putative caspase site (DNID₁₃₇₄) located five amino acids upstream of the stop codon, we investigated whether a caspase cleavage could occur at this site (Figure 1c). Experiments were performed using MDCK cells stably expressing TRK-MET receptors, in which aspartic acid was replaced or not by asparagine in the juxtamembrane (D1000N) and C-terminal (D1374N) regions (Figure 1c). Cell extracts were incubated with active caspase-3 and the TRK-MET receptors detected using either anti-MET or anti-V5 antibodies. Incubation of TRK-MET WT with caspase-3 allowed generation of p40 MET detected with the anti-MET antibody (Figure 1d, left panel). In contrast, p40 MET and full-length MET receptor were not detected using the anti-V5 antibody, demonstrating the C-terminal cleavage (Figure 1d, right panel). As expected, from TRK-MET D1000N expressing cells, p40 MET was not generated, whereas the C-terminal cleavage was still effective. From TRK-MET D1374N, p40 MET was still generated and was detected with the anti-V5 antibody (Figure 1d). The size of the p40 MET fragment generated was slightly increased, in agreement with the presence of the V5 tag. From TRK-MET mutated on both sites, p40 MET generation was abolished and V5 detection of TRK-MET conserved. These results demonstrate that aspartic acid D1374 is required for *in vitro* C-terminal cleavage by caspase-3. Similarly, mutation D1371N resulted in abolition

of the C-terminal cleavage, indicating that the DNID sequence is the caspase target motif (data not shown).

Mutation of the C-terminal caspase site prevents juxtamembrane cleavage. We next evaluated the consequence of mutating the C-terminal caspase site on the fate of the MET receptor subjected to cellular stress. MDCK cells were transiently transfected with TRK-MET chimeras, and cell extracts were analyzed by Western blot using either anti-MET or anti-V5 antibody. In cells transfected with TRK-MET WT, p40 MET and the full-length receptor were detected (Figure 2a). In this condition, p40 MET was detected as a doublet with the upper band corresponding to phosphorylated p40 MET.¹⁹ In cells transfected with TRK-MET D1000N, p40 MET was not observed. It is worth noticing that stress induced by transient transfection was sufficient to promote cleavages. Although this was inhibited by caspase inhibitor (Supplementary data, Figure S1), we did not observe caspase-3 activation in transient transfected cells. This stress could however induce weak activation of caspase-3, which could be under the level of detection or activate other caspases. Importantly, in cells transfected with TRK-MET D1374N detection of p40 MET using an anti-MET antibody was strongly decreased in comparison to TRK-MET WT (Figure 2b, left panel, lanes 2 and 4). The reprobe with V5 antibody shows that remaining p40 MET generated by TRK-MET D1374N is still V5 tagged (Figure 2a, right panel, lane 4). Therefore, this result indicates that mutation of the C-terminal caspase site prevents cleavage within the juxtamembrane region.

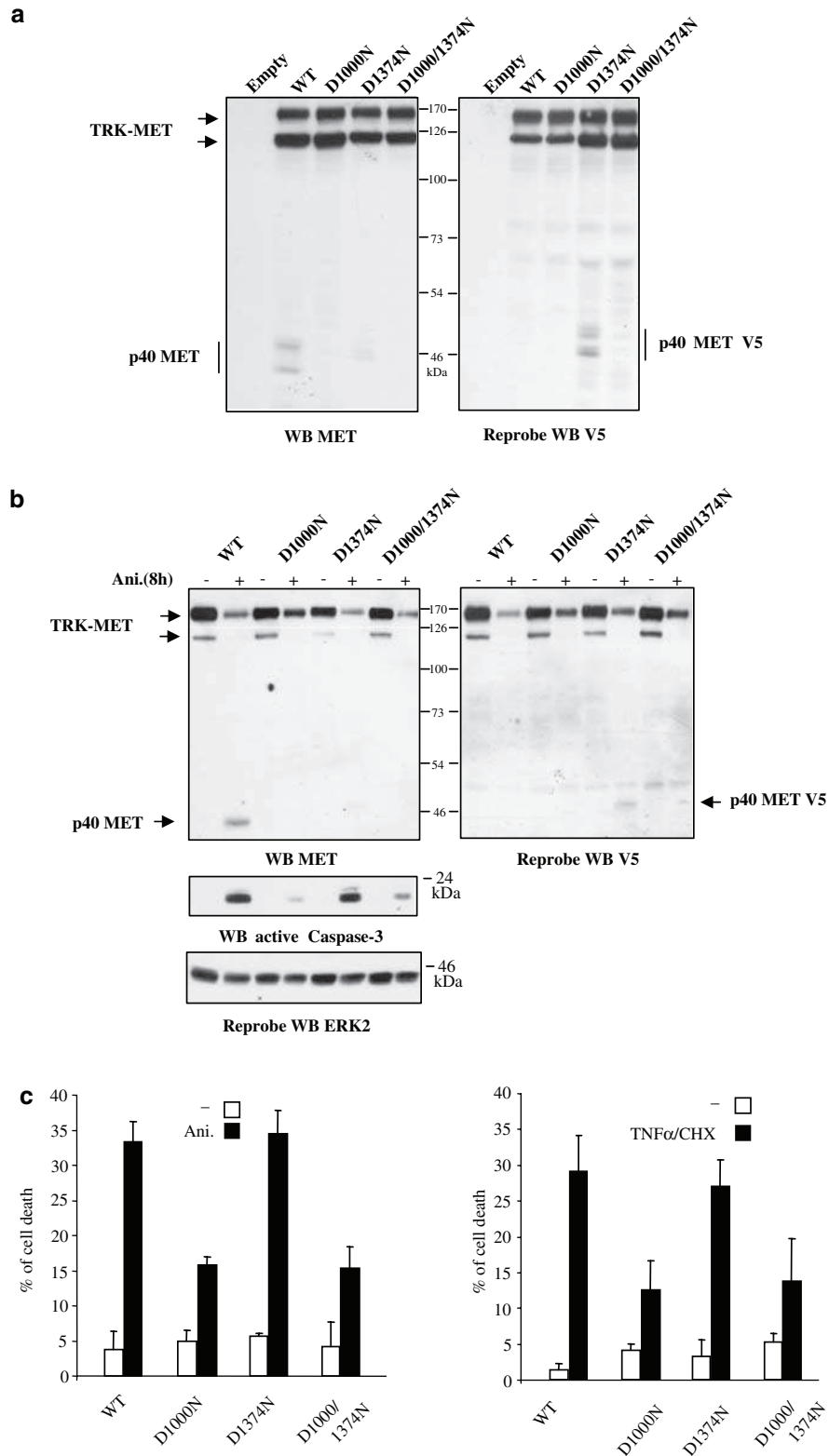
To investigate further this result, apoptosis was induced in stably transfected MDCK cells, which express comparable levels of TRK-MET. As shown in Figure 2b, following proapoptotic stimuli, p40 MET was generated from TRK-MET WT but not from TRK-MET D1000N. Cells expressing TRK-MET with D1000N mutation displayed also lower activation of caspase-3 (Figure 2b) and lower cell death measured by trypan blue exclusion (Figure 2c). This indicates that cells expressing TRK-MET with D1000N mutation were more resistant to apoptosis. These results are consistent with previous studies showing that the aspartic acid D1000 and the adjacent phosphorylated tyrosine Y1001 constitute an interaction motif to CBL, which is involved in ubiquitination and degradation of activated MET.²⁷ Accordingly, it has been shown that mutation of D1000 or Y1001 impaired MET–CBL interaction and induced constitutive scattering of MDCK cells.^{10,25,27} MDCK cells expressing TRK-MET D1000N display similar constitutive scattering (Supplementary Data,

Figure 2 Mutation of the C-terminal caspase site inhibits juxtamembrane cleavage. (a) MDCK cells were transiently transfected with vectors either empty or expressing TRK-MET V5 WT, D1000N, D1374N and D1000/1374N. The following day, cells were lysed. For each condition, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using an antibody directed against mouse MET (left panel). The filter was stripped and reprobed using an anti-V5 antibody (right panel). Arrows indicate positions of TRK-MET V5 and lines indicate positions of p40 MET and p40 MET V5 fragments. (b) MDCK epithelial cells, stably transfected with the TRK-MET V5 WT, D1000N, D1374N, D1000/1374N were treated for 8 h with anisomycin (Ani., 50 μ M). For each condition, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using an anti-mouse MET antibody (top panel). The filter was stripped and reprobed sequentially using an anti-V5 antibody (right panel) and an anti-ERK2 antibody to assess comparable loading (lower panel). Lower part of the filter was analyzed by Western blotting using an anti-active caspase-3 antibody (middle panel). Arrows indicate positions of TRK-MET V5, p40 MET and p40 MET-V5 fragments. (c) Stable MDCK cells were treated for 8 h with either anisomycin (Ani., 50 μ M) or TNF α (30 ng/ml) / cycloheximide (CHX, 10 μ g/ml). Cells were then stained with Trypan Blue. Percentage of dead cells stained in blue were determined ($n = 3$; $\pm$ S.D.)

Figure S2). Importantly, in cells expressing TRK-MET D1374N, generation of p40 MET was strongly decreased (Figure 2b, left panel, lanes 2 and 6). Similar results were obtained in time course experiments following treatment with various apoptotic

inducers, including anisomycin, tumor necrosis factor (TNF) α /cycloheximide and staurosporine (Figure 3).

Together, our results show that mutation of the C-terminal caspase site unfavors juxtamembrane cleavage and then p40



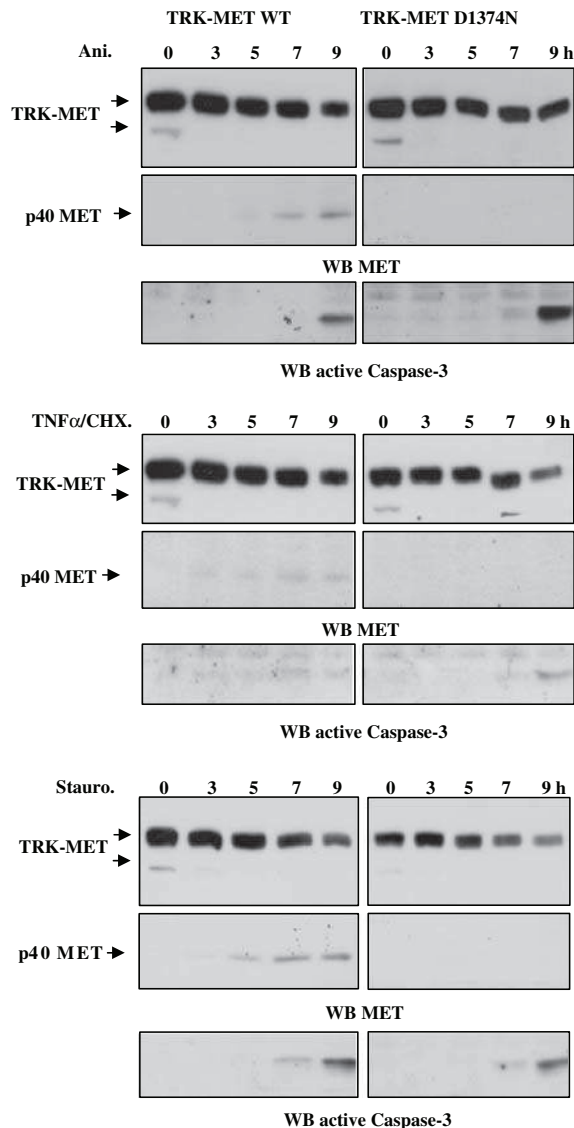


Figure 3 Generation of p40 MET induced during apoptotic process. MDCK epithelial cells expressing TRK-MET V5 WT and D1374N were treated for the indicated times with either anisomycin (Ani., 50 μ M), TNF α (30 ng/ml)/cycloheximide (CHX, 10 μ g/ml) or staurosporine (1 μ M). For each condition, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using an anti-mouse MET antibody (top panel and middle panel). Lower part of the filter was analyzed by Western blotting using an anti-active caspase-3 antibody (lower panel). Arrows indicate positions of TRK-MET V5 and p40 MET fragment

MET generation, revealing the sequential organization of the cleavages. It is worth noting that sequential cleavages of MET are visualized only in cells following stress induction. In fact, during *in vitro* cleavage, mutation of the C-terminal site did not inhibit juxtamembrane cleavage, a likely consequence of efficient cleavage by excess of purified caspase.

Cleavage of MET receptor by caspase-3. To compare the ability of various caspases to cleave MET, cell extracts from MDCK cells expressing TRK-MET V5 were incubated with purified caspases. As shown in Figure 4a, only the caspase-3 was able to generate p40 MET. In addition, in extracts

treated with caspase-3, neither p40 MET nor TRK-MET were detected using the anti-V5 antibody (Figure 4a, right panel), indicating that MET is an *in vitro* substrate of caspase-3 at both sites.

To assess in cells the role of caspase-3 for the cleavage of MET, we transfected TRK-MET receptors in normal MCF-7 cells, which do not express caspase-3 and in MCF-7 cells in which functional caspase-3 was reintroduced (MCF-7/caspase-3)²⁸ (Figure 4b). In MCF-7/caspase-3 cells, p40 MET detection was strongly increased in comparison to normal MCF7 (Figure 4b, left panel). It should be noted that transfection of TRK-MET without additional stress was sufficient to induce generation of p40 MET, which was abolished by the caspase inhibitor (Supplementary data, Figure S1). The C-terminal cleavage was effective as well, as p40 MET was not detected using the anti-V5 antibody (Figure 4b, right panel). This demonstrates that caspase-3 favors cellular cleavage of MET.

Juxtamembrane and C-terminal cleavages of the human MET receptor. The C-terminal tail of MET receptor is poorly conserved (Figure 5a). In zebra fish and *xenopus*, a potential caspase motif was not found, whereas in chicken, dog and mouse, a consensual caspase motif is present (DXXD). In ape and human, the site appears to be duplicated (DXDDXXD).

We found that anti-MET antibodies directed against the C-terminal tail of the human receptor were not able to recognize truncated MET from the D1376 of the C-terminal caspase site (Supplementary data, Figure S3A). Using these antibodies, we checked whether human p40 MET is cleaved in C-terminal. We transiently transfected MCF-7/caspase-3 cells with full-length human MET WT, kinase dead or mutated in the juxtamembrane caspase site. Using an anti-MET antibody recognizing the kinase domain, the WT and kinase dead MET receptors and their p40 MET fragments were detected. As expected, the fragment was not generated from the juxtamembrane caspase site mutant (Figure 5b, left panel). In contrast, using the anti-human MET antibody recognizing the C-terminal extremity, the full-length MET were detected, whereas p40 MET fragments were not (Figure 5b, right panel). These results show that, similarly to mouse MET, human p40 MET is cleaved in its C-terminal extremity.

In order to follow C-terminal and juxtamembrane endogenous cleavages of human MET during apoptosis, human epithelial cells from cervical carcinoma (HeLa cells) were treated with anisomycin and lysed every hour. Western blot using anti-MET kinase revealed both full-length MET, which detection decreases only slightly along apoptosis, and p40 MET, generated from 1 h after treatment (Figure 5c, left panel). In contrast, reprobe with anti-MET C-terminal antibody showed strong decrease of full-length MET detection along apoptosis and absence of p40 MET detection. Inversion of the order of probing between the antibodies gave similar results (Supplementary Data, S3B). These results confirm the C-terminal cleavage of human p40 MET and further demonstrate the existence of a membrane anchored MET receptor C-terminally truncated, which becomes the major form along apoptosis.

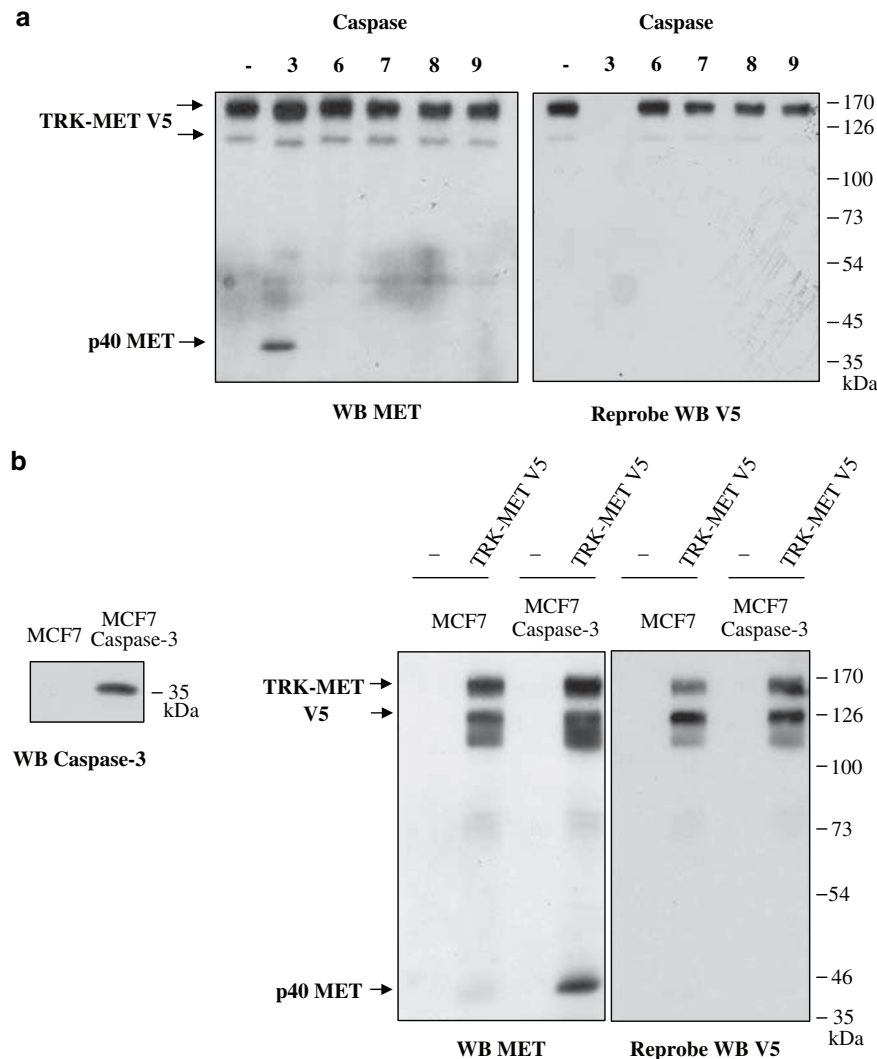


Figure 4 Caspase-3 cleaves the MET receptor. (a) Cell extracts of MDCK, stably transfected with the TRK-MET V5 WT chimera, were incubated with purified caspase-3, -6, -7, -8 or -9. Samples were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western-blotting using an antibody directed against mouse MET (left panel). The filter was stripped and reprobed using an anti-V5 antibody (right panel). (b) MCF-7 and MCF-7/caspase-3 cells were transiently transfected with vectors either empty or expressing TRK-MET V5 WT. The following day, cells were lysed. For each condition, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using an anti-mouse MET antibody (left panel). The filter was stripped and reprobed using an anti-V5 antibody (right panel). Western blotting using an anti-caspase-3 antibody was performed to assess expression of caspase-3 in MCF-7 and MCF-7/caspase-3. Arrows indicate positions TRK-MET and p40 MET fragment

C-terminal cleavage of p40 MET enhances its proapoptotic activity. In order to evaluate the biological relevance of the C-terminal truncation of p40 MET, we engineered a p40 MET long (from the juxtamembrane cleavage site to the C-terminal end) and p40 MET small (from the juxtamembrane to the C-terminal cleavage site). Immunofluorescence analysis revealed expression of p40 MET constructs both in cytoplasm and nucleus of transiently transfected NIH3T3. p40 MET-expressing cells were rounded and Hoechst staining showed characteristic signs of apoptosis, with either strong decrease of DNA contents or condensed DNA (Figure 6a, top panels). Interestingly, about 17% of p40 MET small-transfected cells were positive for active caspase-3 staining, whereas 12% of active caspase-3-positive cells were observed in p40 MET long-expressing

cells, indicating that the C-terminal cleavage enhances the proapoptotic activity of the fragment (Figure 6a, lower panels). p40 MET small kinase dead-expressing cells displayed normal morphology, with percentage of active-caspase-3 positive cells corresponding to basal apoptosis in transfected cells. Similar results were obtained by counting the apoptotic nuclei in Hoechst staining. Cells expressing TPR-MET, the oncogenic form of MET, displayed normal morphology with level of cell death similar to p40 MET kinase dead (Figure 6b), indicating that ectopic expression of constitutive active MET kinase does not lead to apoptosis.

To assess these results, HEK293 cells were transfected with p40 MET constructs and selected with G418, as the expression vector contains this antibiotic resistance gene. After 10 days of selection, non-transfected and p40 MET

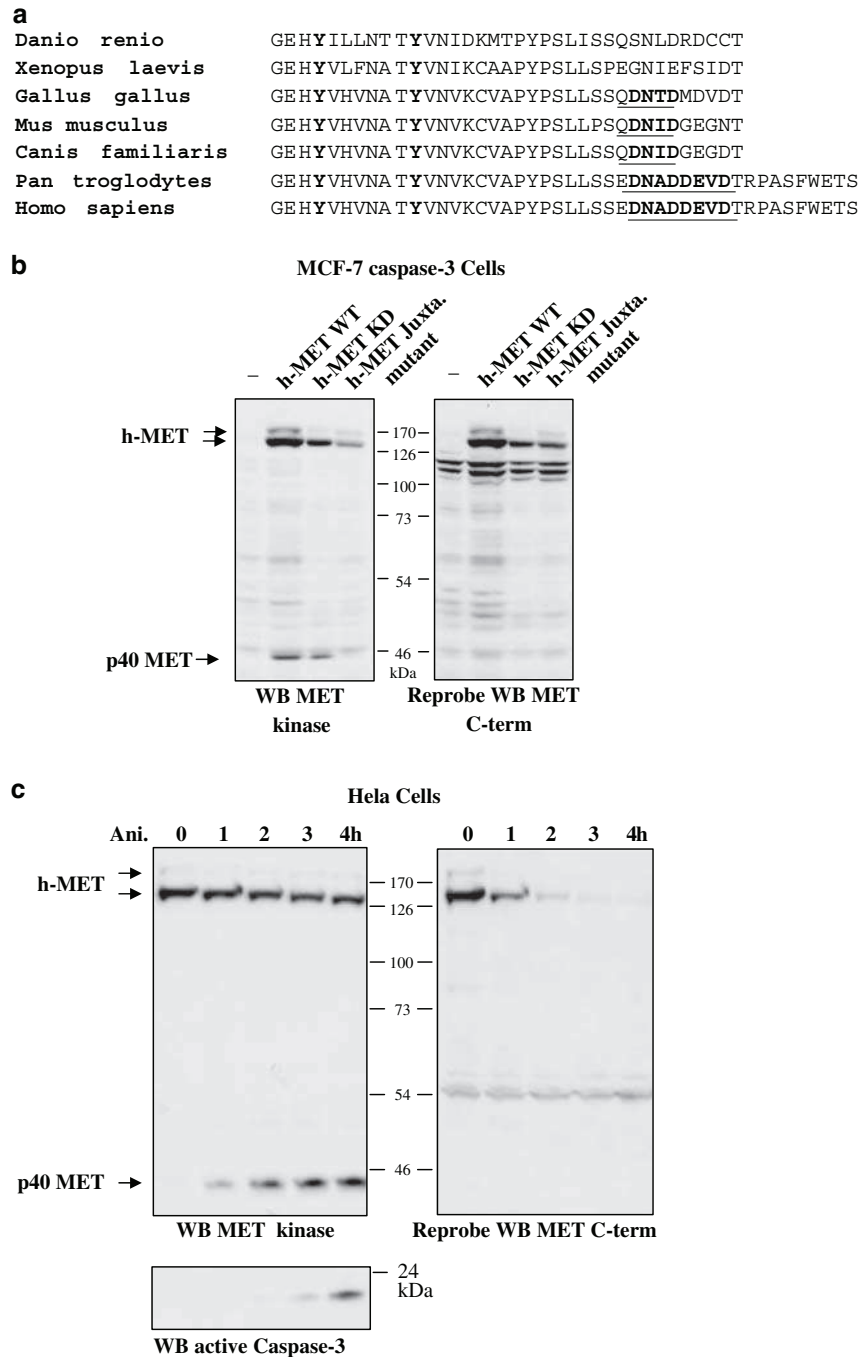


Figure 5 Human MET is cleaved by caspases in its C-terminal extremity. **(a)** Alignment of the amino-acid sequences of *Danio renio*, *Xenopus laevis*, *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Canis familiaris*, *Pan troglodytes* and *Homo sapiens* MET tyrosine kinase receptor. The tyrosine residues of the C-terminal multi-substrate binding site are in bold and the putative caspase sites are in bold and underlined. **(b)** Caspase-3 reconstituted MCF-7 cells were transiently transfected with 1 μ g/ml of vector either empty or expressing human-MET WT, kinase dead (KD) or uncleavable mutant (Juxta. Mutant) in which the valine residue V1001 of the juxtamembrane cleavage site was replaced by alanine (V1001 in the human sequence corresponds to V999 in the murine sequence). The following day, cells were lysed. For each condition, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using an antibody directed against the kinase domain of MET (left panel). The filter was stripped and reprobed using an antibody recognizing the C-terminal extremity of human MET (C-28 antibody) (right panel). Arrows indicate positions of immature and mature MET and p40 MET fragment. **(c)** HeLa cells were treated for the indicated times with anisomycin (Ani., 50 μ M). For each condition, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using an antibody directed against the kinase domain of MET (left panel). The filter was stripped and reprobed using an antibody recognizing the C-terminal extremity of human MET (C-12 antibody) (right panel). Lower part of the filter was analyzed by Western blotting using an anti-active caspase-3 antibody (lower panel). Arrows indicate positions of immature and mature MET and p40 MET fragment

transfected cells died, whereas more than 60% of cells transfected with p40 MET kinase dead survived, using empty vector as a reference (Figure 6c). In addition, we found that p40 MET small was more potent than p40 MET long to induce cell death. This effect was even stronger with p40 MET D1371N, suggesting that cell death induced by p40 MET long is in part the consequence of further C-terminal cleavage. Two days following transfection and before G418 selection, p40 MET expression was checked (Figure 6d). At this stage, all the p40 MET were expressed and in contrast to p40 MET kinase dead, p40 MET long and small were detected as a smear, corresponding to their phosphorylated and non-phosphorylated forms (Figure 6d). In the majority of experiments, p40 MET kinase dead is less expressed than the p40 MET WT, a likely consequence of its instability. This could affect the cell death induced in HEK293 cells. However, we show in Supplementary Figure S4 that when p40 MET WT and kinase dead are expressed at similar level, we still observed efficient survival with p40 MET kinase dead. Overall, these results demonstrate that the C-terminal cleavage of p40 MET fragment enhances its proapoptotic activity.

Mutation of C-terminal caspase site prevents cell death induced by mild stress. Generation of p40 MET can be prevented by mutations in the juxtamembrane region (D1000N) and C-terminal tail (D1374N). However, TRK-MET D1000N cells display constitutive scattered phenotype (Supplementary data, Figure S2) and were resistant to apoptosis (Figure 2b). In contrast, cells expressing TRK-MET WT and TRK-MET D1374N displayed normal islet organization and scattered similarly in response to NGF and HGF/SF (Figure 7a). In addition, in response to NGF, TRK-MET WT and D1374N were similarly able to recruit the signaling protein GRB2 and activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) extracellular-regulated kinase (ERK) (Figure 7b). These results indicate that D1374N mutation does not modify basal and ligand-induced activity of TRK-MET chimera. We therefore used the TRK-MET D1374N cells to evaluate the involvement of p40 MET generation in apoptosis.

In order to evaluate the consequence of p40 MET generation during the apoptotic response, we treated TRK-MET WT or TRK-MET D1374N cells with a low dose of anisomycin. In this mild stress condition, TRK-MET WT cells began to detach by day 3 and all cells died by day 7 (Figure 7d). This cell death correlated with generation of the p40 MET fragment and caspase-3 activation (Figure 7c). In contrast, in TRK-MET D1374N cells, anisomycin treatment

did not induce cell detachment, and caspase-3 or p40 MET were not detected even after 7 days. Therefore, the prevention of C-terminal cleavage of MET and subsequent decreased of p40 MET generation allowed resistance to cell death.

Discussion

In this report, we show that the MET tyrosine kinase receptor is cleaved during apoptosis in a caspase-dependent manner in both its juxtamembrane and C-terminal regions. Mutation analysis in mouse MET demonstrates that these cleavages occur at aspartic acid 1000 and 1374. The C-terminal cleavage generates an undetectable fragment constituted by the last five amino acids of mouse MET. Nonetheless, this cryptic cleavage was evidenced using a C-terminal tagged version of the TRK-MET receptor, in which the loss of the C-terminal V5 epitope enlightens the cleavage.

The amino-acid sequence of the C-terminal extremity is poorly conserved along evolution (Figure 5a). However, we demonstrated that mouse and human MET receptors are cleaved by caspases in this sequence, within a functional caspase site. Sequences analysis suggests a strengthening of the C-terminal caspase site according to animal species. Indeed, no consensual caspase site was found in the C-terminal tail of fishes and *xenopus* MET, this site (DXXD) is present in chicken, dog and mouse and is duplicated in ape and human (DXDDXXD). Thus, although the extreme C-terminal tail of MET is poorly conserved, we identified a functional caspase site, which allows cleavage of MET during apoptosis.

Although the C-terminal cleavage eliminates only the last five amino acids of mouse MET, it has strong consequences on the mechanisms by which p40 MET is generated. First, we evidence a hierarchical organization of the cleavages, with the C-terminal cleavage favoring the juxtamembrane one. These two cleavages may therefore correspond to a double lock capable to prevent generation of p40 MET. As a second consequence of the double cleavage, a p40 MET fragment shortened of the last five amino acids is generated and is more potent to induce apoptosis. Together, these results demonstrate that the C-terminal cleavage is involved in the reshaping of the MET receptor to a proapoptotic factor.

The identification of the C-terminal cleavage and its functional consequences on p40 MET suggests that the C-terminal extremity is a regulatory domain. For some tyrosine kinase receptors, C-terminal tails were evidenced as negative regulatory domains. For instance, deletion of the C-terminal sequences of Tie2 or platelet-derived growth factor beta

Figure 6 C-terminal cleavage enhances cell death induced by p40 MET. (a and b) NIH3T3 cells were transiently transfected with vectors expressing either p40 MET small wild-type (p40 MET small), p40 MET small kinase dead (p40 MET KD), p40 MET long or TPR-MET. Forty-eight hours after transfection, nuclei were detected using Hoechst staining (Hoechst, Blue staining) and immunofluorescence was performed using an anti-MET antibody (Anti-MET, green staining) and an anti-cleaved caspase-3 (Anti-cleaved Caspase-3, red staining). White arrows indicate representative cells expressing transfected p40 MET. Percentage of caspase-3 positive cells and apoptotic nuclei (condensed DNA) over MET transfected cells was determined. At least 200 cells were counted per well in three different wells ($n = 3$; $\pm$ S.D.). (c) HEK293 cells, cultured in six-well plates, were transfected or not with empty vector or vector expressing p40 MET small, p40 MET small KD, p40 MET long or p40 MET long D1371N. Two days later, cells were split into four 100-mm dishes and the remaining cells were lysed for Western blot analysis. Cells were then selected 10 days with G418 and counted. Results are represented as percentage of surviving cells using empty vector transfection as reference ($n = 3$; $\pm$ S.D.). One dish from each condition was also stained and shown (lower panel). (d) Cell extracts prepared the second day after transfection were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using an anti-mouse MET antibody to assess expression from the transfected vector (top panel). The filter was stripped and reprobed using an anti-phospho MET antibody (lower panel)

receptor (PDGF β -R) potentiates their tyrosine kinase activity.^{29,30} For MET an inhibitory role of the C-terminal tail has been proposed, based on the fact that a peptide centered on the

C-terminal multi-substrate binding site inhibited the kinase activity.³¹ It is then attractive to propose that the C-terminal cleavage of MET could relieve an inhibitory conformation,

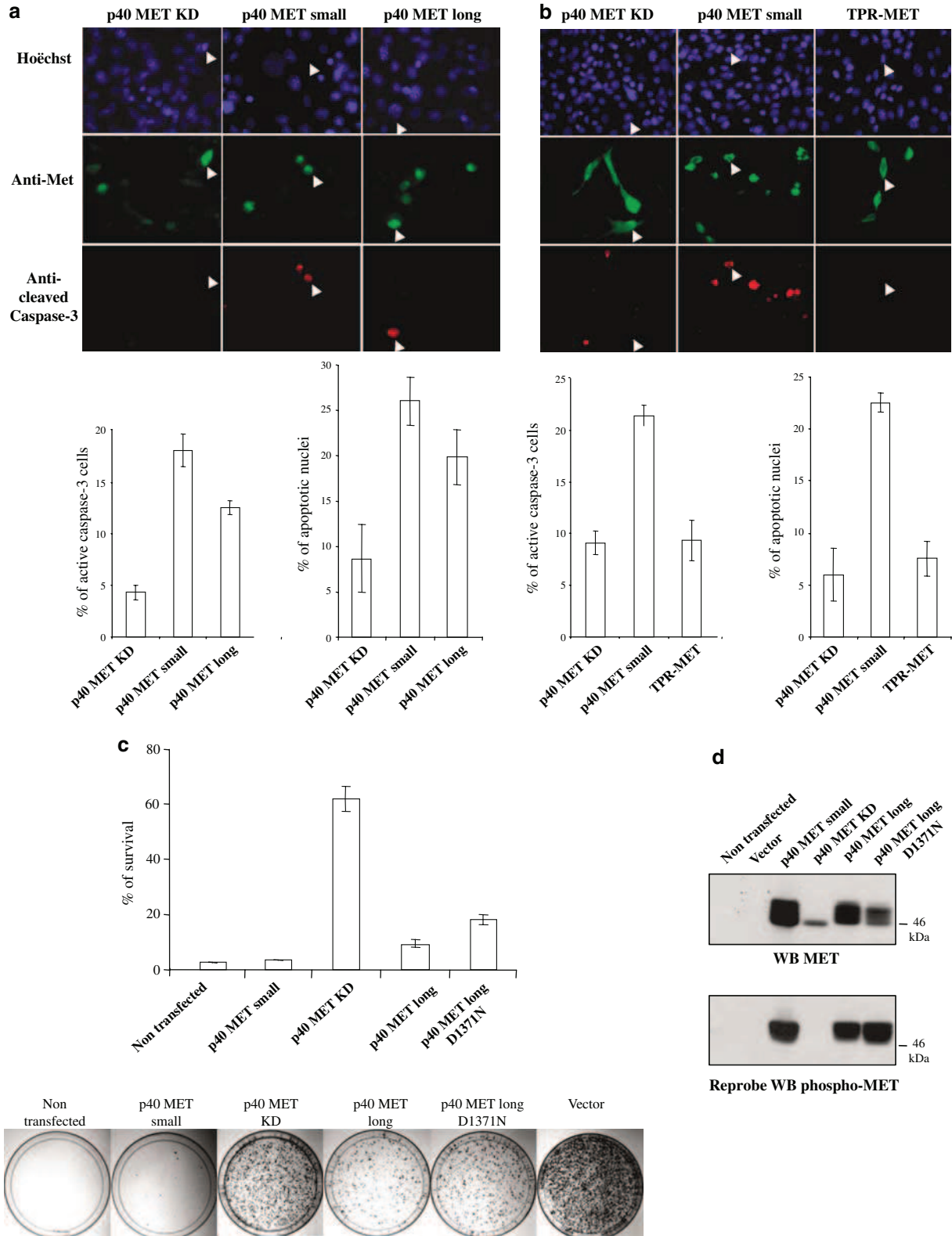


Figure 6

which could be involved in induction of the apoptotic response.

Our demonstration that p40 MET is apoptotic raise the question whether it contributes to amplification of cells death. The TRK-MET D1000N cells were useless for this purpose. Indeed, the aspartic acid D1000 belongs to the CBL binding motif (DYR), which contributes to MET ubiquitination and downregulation in response to HGF/SF.²⁷ Mutation of tyrosine 1001 or aspartic acid 1000 decreases CBL binding, leading to constitutive scattering of MDCK cells^{25,27} and resistance to apoptosis. However, in this study, by identifying an additional caspase cleavage site, we generated a second mutant in which p40 MET generation is prevented. In contrast to D1000N mutation, D1374N mutation did not modify MET properties, including its ability to mediate RAS-ERK signaling activation and cell scattering. Under mild stress conditions, TRK-MET D1374N cells displayed prolonged cell survival compared to TRK-MET WT cells, indicating that p40 MET generation amplifies cell death. This amplification of apoptosis was not observed in MDCK expressing TRK-MET WT and D1374N, when high dose of anisomycin, which induced massive cell death within hours, was used. These results indicate that p40 MET generation is dispensable for induction of apoptosis induced by strong stress stimuli, whereas it is able to switch the cells to apoptosis in mild stress conditions. In this line, it is worth noticing that p40 MET is not a strong inducer of apoptosis, with level of apoptosis in p40 MET transfected cells not exceeding 20%. We therefore conclude that p40 MET can act as an amplifier rather than as an inducer of apoptosis.

Although many caspase substrates are cleaved at several sites,³² the hierarchical organization of these cleavages is poorly defined. The Ras GTPase-activating protein (RasGAP) protein is cleaved at several sites by caspase-3, with the first cleavage occurring soon during apoptosis and favoring the second one.^{33,34} The first cleavage allows generation of an anti-apoptotic fragment, whereas the second cleavage converts it in smaller proapoptotic fragments. In this instance, sequential cleavage supports a model in which RasGAP functions as a sensor of caspase activity to determine whether cell will survive or not.³⁵ In the case of MET, its sequential cleavages lead to the generation of a shortened MET, cleaved only in its C-terminal region. Although, following this first cleavage, the juxtamembrane cleavage allows generation of p40 MET, the shortened MET becomes along apoptotic the major form of membrane MET receptors. This novel form of MET potentially inducible by HGF/SF could acquire specific functions, which could be involved as well in the regulation of

the balance survival/apoptosis mediated by the tyrosine kinase receptor MET.

Materials and Methods

Cytokines, drugs and cell cultures. Human recombinant HGF/SF was purchased from Peprotech and β -NGF and TNF- α from R&D Systems. Anisomycin was purchased from Calbiochem, cycloheximide from ICN Biomedicals and staurosporine from Sigma. The general caspase inhibitor, Z-Val-Ala-Asp (OMe)-fluoromethyl ketone (zVAD-FMK) was purchased from Kamiya Biomedical Company. MDCK epithelial cells, 293 human embryonic renal epithelial cell line (HEK293) and HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Invitrogen) and antibiotics. MCF-7 cells and MCF-7/caspase-3 cells (kindly provided by Reiner Jänicke, University of Dusseldorf, Germany) were cultured in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% FCS and antibiotics. Mouse fibroblasts NIH3T3 were cultured in DMEM medium supplemented with 10% heat-inactivated calf serum (Hyclone). Cells were cultured at 37°C in water-saturated 5% CO₂ atmosphere.

Plasmid constructions. The TRK-MET V5-His chimeras were described previously.¹⁹ Briefly, the original TRK-MET chimeras cloned in pBAT vector, which allow expression of extracellular TRKA receptor fused to the transmembrane and cytoplasmic region of mouse MET,²⁵ were cloned in pcDNA 3.1 V5-His C plasmid (Invitrogen). The TRK sequence, up to the *Bam*HI restriction site, was cut out by digestion using *Hind*III and *Bam*HI restriction enzymes and cloned into pcDNA 3.1 V5-His plasmid. The remaining TRK-MET sequence, from the *Bam*HI restriction site to the 3' end, was amplified by PCR using the primer containing the *Bam*HI restriction site and primer containing the *Xho*I restriction site, using pBAT TRK-MET as template. The PCR product was subcloned into a pGEM plasmid (pGEM Easy kit; Stratagene). MET in which aspartic acid 1374 was replaced by an asparagine, was created using the QuickChange site-directed mutagenesis system from Stratagene, using pGEM MET WT or D1000N as template and the following primers: 5'-CCCAAGACAACATTAATGGCGAGGGG-3' and 5'-CCCCTCGCCATT AATGTTGTCTTGGG-3'. Insertion of the mutation was verified by sequencing. Finally, MET sequence from pGEM was inserted in pcDNA3 TRK using *Bam*HI and *Xho*I restriction site. The other mutations were described previously.¹⁹

Full-length human MET, in which valine residue V1001 (V1001 in human sequence corresponding to V999 in murin sequence) of the juxtamembrane cleavage site was replaced by alanine, was created using the QuickChange site-directed mutagenesis system, using pMT2 human MET WT (generously gift by Flavio Maina, IBDM, Marseille, France) as template and the following primers: 5'-CA AATGAATCTGCAGACTACCGAGCTAC-3' and 5'-GTAGCTCGGTAGTCTGCAGA TTCATTTG-3'. Insertion of the mutation was verified by sequencing.

The N-terminal Flag p40 MET long was constructed as follows: the mouse MET from the juxtamembrane caspase site to the C-terminal end was amplified by PCR using TRK-MET WT as template and the following primers: 5'-CAAATGAGTCTGG ATCCTACAGAGCTAC-3' containing the *Bam*HI restriction site and the primer 5'-C CTCGAATCGAGACCTCAAGTGTCCCC-3' containing the *Xho*I restriction site. The N-terminal Flag p40 MET small and p40 MET small kinase dead version (p40 MET Small K1108A) were constructed as follows: the mouse MET from the juxtamembrane caspase site to the C-terminal caspase site was amplified by PCR using TRK-MET WT and TRK-MET K1108A as templates and the following primers: 5'-CAAATGAGTCTGGATCCTACAGAGCTAC-3' containing the *Bam*HI restriction site and the primer 5'-TCTCGAGTTCCTCTCAATCAATGTTGTC-3' containing

Figure 7 Influence of the C-terminal caspase site mutation in cell death induced by mild stress. (a) MDCK epithelial cells expressing TRK-MET V5 WT and D1374N were seeded at low density. Two days later, cells were cultured for 24 h in the absence (—) or presence of 10 ng/ml of HGF/SF or 100 ng/ml of NGF and photographs were taken (magnification $\times 80$). (b) MDCK epithelial cells (1.10^5 cells/100 mm-dish) expressing or not TRK-MET V5 WT and D1374N were cultured over-night in DMEM-0% FCS and stimulated or not 10 min with 200 ng/ml of NGF. For each condition, the same amount of whole cell lysate was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using an anti-mouse MET antibody (first panel) or an anti-phosphorylated ERK1 and 2 (second panel) antibody. The filter was stripped and reprobed using an anti-ERK2 antibody (third panel). From the same extracts, immunoprecipitation was performed using a polyclonal antibody against mouse MET and processed for Western blotting using an anti-GRB2 antibody (last panel). (c) MDCK epithelial cells (2.10^5 cells/35 mm-dish), stably transfected with the TRK-MET V5 WT or D1374N were cultured 1 day in DMEM-10% FCS and treated with anisomycin (Ani., 0.3 μ M). Every day, cells were lysed and proteins were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using an antibody directed against mouse MET (top panels). Similar extracts were resolved by a 12% SDS-PAGE and Western blotting was performed using an anti-active caspase-3 antibody (lower panel). Arrows indicate positions of TRK-MET V5 and p40 MET. (d) Photographs were taken on light microscopy before lysis (magnification $\times 40$)

the *Xho*I restriction site. The sequences obtained were cloned using *Bam*HI/*Xho*I in frame with Flag sequence in pcDNA3 vector.

The oncogene TPR-MET was constructed as follows: TPR-MET sequence was amplified by PCR using pXM139 SMS TPR-MET as template (generously gift by

Morag Park, McGill University, Montreal, Quebec, Canada) and the primers 5'-GCG CCGGCCTCGAGTCATGGCGGCGGTG-3' containing the *Xho*I restriction site and 5'-TCAGTCTAGATCTGATGCTCTGTGTCAG-3' containing the *Xba*I restriction site. The TPR-MET sequence was cloned in pcDNA3 vector using the *Xho*I/*Xba*I sites.

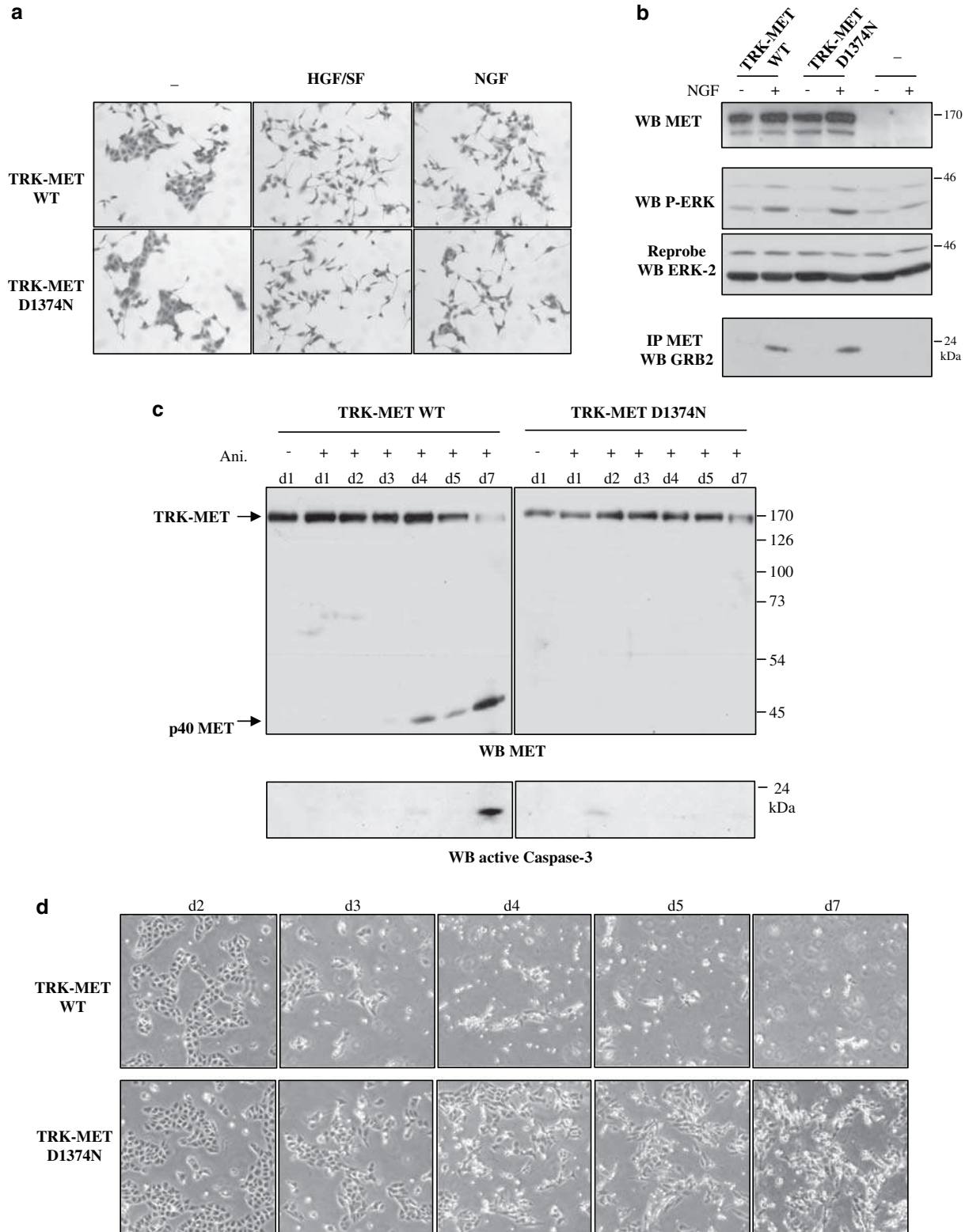


Figure 7

The TPR-MET kinase dead (TPR-MET KD) in which lysine 1110 was replaced by arginine was created using the QuickChange site-directed mutagenesis system from Stratagene using pcDNA3 TPR-MET as template and the following primers: 5'-CACTGTGCTGTGGCATCCTTGAACAGAATC-3' and 5'-GATTCTGTTCAAGGATGCCACAGCAGTG-3'. TPR-MET truncated from aspartic acid 1376 (TPR-MET δ Ct) was created using the QuickChange site-directed mutagenesis system using pcDNA3 TPR-MET as template and the following primers: 5' GATAACGCTGAT-TAGTGCTAGTACTATGTC 3' and 5' GACATAGTACTAGCACTAATCAGCGTTATC 3'.

Antibodies. Mouse monoclonal antibody directed against mouse MET (B-2) and rabbit polyclonal antibodies against C-terminal region of human MET (C-28 and C-12), against mouse MET (SP-260) and against ERK2 (C-14) were purchased from Santa-Cruz Biotechnology. Mouse monoclonal antibodies directed against the kinase domain of MET (25H2) and directed against phosphorylated ERK and rabbit polyclonal antibody against cleaved caspase-3 were purchased from Cell Signaling Technology. Rabbit polyclonal antibody against phosphorylated tyrosines 1234 and 1235 of MET kinase domain was purchased from Upstate Biotechnology. Rabbit polyclonal antibody against caspase-3 was purchased from Stressgen Biotechnologies. Mouse monoclonal antibody directed against V5 tag was purchased from Invitrogen. Mouse monoclonal antibody against GRB2 was purchased from Transduction Laboratories. Peroxydase, fluorescein and rhodamine conjugated antibodies directed against rabbit and mouse IgG were purchased from Jackson Immunoresearch Labs.

Western blotting. MDCK and MCF-7 cells (3.10^5 cells/35 mm-dish) transfected or not were cultured 1 day in DMEM-10% FCS and RPMI-10% FCS, respectively, and treated or not with anisomycin, TNF α /cycloheximide or staurosporine in serum free medium. Adherent cells and cells in suspension, collected after centrifugation of the medium, were lysed and protein concentration determined by Bio-Rad protein assay. Western blotting was performed as described previously.³⁶ Results are representative of at least two experiments.

Trypan blue staining. MDCK cells were cultured in the same condition that described previously. Adherent cells, detached with trypsin, and cells in suspension, collected after centrifugation of the medium, were collected and stained with trypan Blue (Sigma) (PBS/trypan Blue, vol/vol) for 15 min at room temperature. Unstained cells (cells alive) and blue cells (dead cells) were counted in Malassez hematimeter.

Caspase cleavage reaction. Caspase cleavages using cell extract were performed as follows: MDCK cells stably transfected with the TRK-MET chimeras (3.10^5 cells/35 mm-dish) were cultured 1 day in DMEM-10% FCS and then lysed in 100 μ l of caspase buffer (20 mM PIPES pH 7.2; 100 mM NaCl; 1% Chaps; 10% sucrose; 5 mM DTT; 0.05 mM EDTA). Cell extracts were incubated 4 h at 37°C with 1 μ l of purified caspase. Proteins were then resolved on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and submitted to Western blotting.³⁶ Purified active caspases were generously provided by Dr GS Salvesen (The Burnham Institute, La Jolla, CA, USA). Titration of the active recombinant caspases have been obtained using *in vitro* cleavages against synthetic substrates as described previously³⁷ (Caspase-3, 13.9 μ M; Caspase-6, 7.5 μ M; Caspase-7, 19.7 μ M; Caspase-8, 15 mM; Caspase-9, 41.5 μ M).

Transfections. Transient and stable transfections of MDCK cells were performed as described previously using the lipofection method.²⁶ For transient transfection of NIH3T3 fibroblasts, 8.10^4 cells were cultured in 12-well plates and were incubated with a mixture of DNA (1 μ g/ml) and Lipofectamine (Invitrogen; 20 μ g/ml). MCF7 cells (3.10^5) were cultured in six-well plates and were incubated with a mixture of DNA (1.25 μ g/ml) and PEI/ExGen 500 (Euromedex).

Immunofluorescence. NIH3T3 cells (80×10^3 cells/24 mm-dish) were cultured for 1 day in DMEM-10% CS on glass coverslips and transiently transfected as described above. Forty-eight hours after transfection, cells were washed, fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% triton X-100, and blocked with 0.2% casein for 30 min. Cells were incubated 60 min with a combination of mouse anti-Met antibody (1:200) and rabbit anti-active caspase-3 antibody (1:200). Cells were then washed and incubated with a combination of fluorescein-conjugated anti-mouse IgG (7 μ g/ml) and rhodamine-conjugated anti-rabbit IgG (7 μ g/ml). Cell nuclei were counterstained using Hoechst 33258. Coverslips were mounted with Glycergel mounting medium (Dako) and fluorescence examined using a Zeiss Axioplan2. Results presented are representative of three experiments.

Colony-formation assay. For the colony formation assay, 6×10^5 HEK293 cells/well were plated in six-well plates, and the next day transient transfections were performed using the polyethyleneamine Exgen 500 procedure (Euromedex) using 1 μ g of DNA/well. Two days after transfection, cells were split into three 100-mm dishes containing DMEM-10% FCS, and the next day the medium was supplemented with 1.1 mg/ml G418 (Gibco). After 2 weeks, cells were counted.

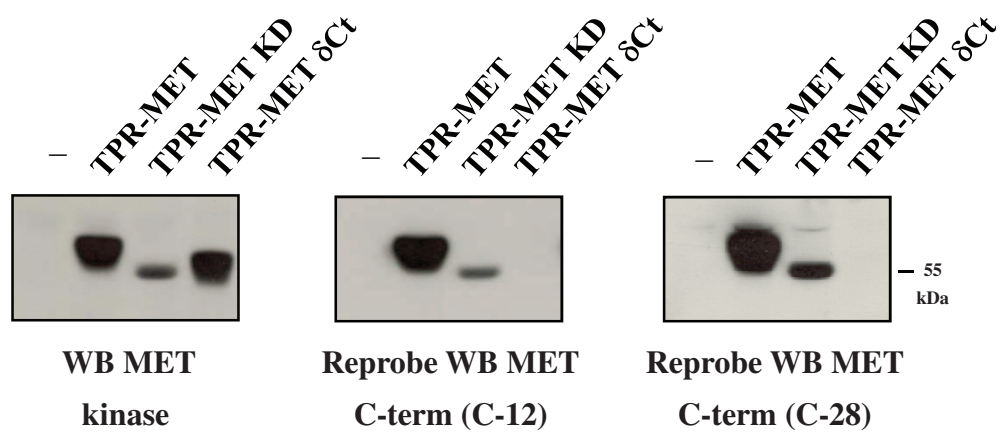
Acknowledgements. This work was supported by the CNRS, the Institut Pasteur de Lille, INSERM, University of Lille 1 and University of Lille 2 and by grants from, the 'Fondation de France' (FdF), the Feder and the 'Ligue contre le Cancer, comité Nord'. BF was supported by a 'Institut Pasteur/Région Nord- Pas de Calais' fellowship, JD by a 'Association pour la Recherche sur le Cancer' (ARC) fellowship and ZJ by Fondation de France fellowship.

1. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; **122**: 1450–1459.
2. Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino GK, Bardelli A, Ponzetto C *et al*. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J* 1991; **10**: 2867–2878.
3. Stoker M, Perryman M. An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J Cell Sci* 1985; **77**: 209–223.
4. Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L, Comoglio PM. Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene* 1994; **9**: 49–57.
5. Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S *et al*. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 1994; **77**: 261–271.
6. Weidner KM, Dicesare S, Sachs M, Brinkmann V, Behrens J, Birchmeier W. Interaction between gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* 1996; **384**: 173–176.
7. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 915–925.
8. Crepaldi T, Prat M, Giordano S, Medico E, Comoglio PM. Generation of a truncated hepatocyte growth factor receptor in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1750–1755.
9. Gandino L, Longati P, Medico E, Prat M, Comoglio PM. Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1815–1820.
10. Peschard P, Fournier TM, Lamorte L, Naujokas MA, Band H, Langdon WY *et al*. Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell* 2001; **8**: 995–1004.
11. Villa-Moruzzi E, Puntoni F, Bardelli A, Vigna E, De Rosa S, Comoglio PM. Protein tyrosine phosphatase PTP-S binds to the juxtamembrane region of the hepatocyte growth factor receptor Met. *Biochem J* 1998; **336**: 235–239.
12. Vigna E, Gramaglia D, Longati P, Bardelli A, Comoglio PM. Loss of the exon encoding the juxtamembrane domain is essential for the oncogenic activation of TPR-MET. *Oncogene* 1999; **18**: 4275–4281.
13. Kosai K, Matsumoto K, Nagata S, Tsujimoto Y, Nakamura T. Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **244**: 683–690.
14. Bowers DC, Fan S, Walter KA, Abounader R, Williams JA, Rosen EM *et al*. Scatter factor/hepatocyte growth factor protects against cytotoxic death in human glioblastoma via phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT- dependent pathways. *Cancer Res* 2000; **60**: 4277–4283.
15. Xiao GH, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsuuchi Y, Vande Woude GF, Testa JR. Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 247–252.
16. Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 1995; **376**: 768–771.
17. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M *et al*. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995; **373**: 699–702.
18. Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shlota K, Kuno J, Noda T *et al*. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 1995; **373**: 702–705.
19. Tulasne D, Deheuninck J, Lourenco FC, Lamballe F, Ji Z, Leroy C *et al*. Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 10328–10339.
20. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene* 2003; **22**: 8543–8567.
21. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; **391**: 96–99.

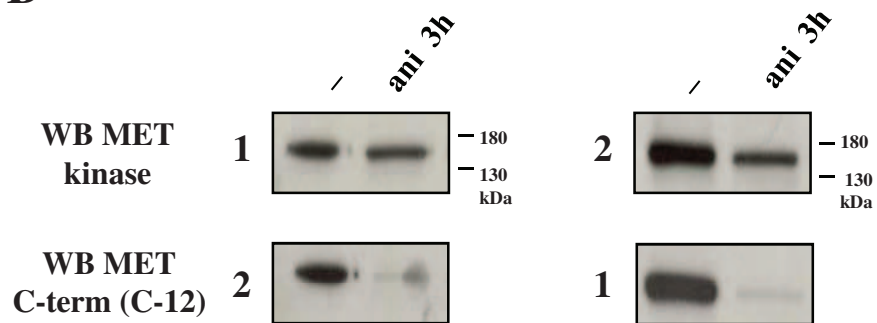
22. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; **391**: 43–50.
23. Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 346–352.
24. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 339–345.
25. Weidner KM, Sachs M, Birchmeier W. Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 2597–2601.
26. Tulasne D, Paumelle R, Weidner KM, Vandenbunder B, Fafeur V. The multisubstrate docking site of the MET receptor is dispensable for MET-mediated RAS signaling and cell scattering. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 551–565.
27. Peschard P, Ishiyama N, Lin T, Lipkowitz S, Park M. A conserved DpYR motif in the juxtamembrane domain of the Met receptor family forms an atypical c-Cbl/Cbl-b tyrosine kinase binding domain binding site required for suppression of oncogenic activation. *J Biol Chem* 2004; **279**: 29565–29571.
28. Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998; **273**: 9357–9360.
29. Chiara F, Bishayee S, Heldin CH, Demoulin JB. Autoinhibition of the platelet-derived growth factor beta-receptor tyrosine kinase by its C-terminal tail. *J Biol Chem* 2004; **279**: 19732–19738.
30. Niu XL, Peters KG, Kontos CD. Deletion of the carboxyl terminus of Tie2 enhances kinase activity, signaling, and function. Evidence for an autoinhibitory mechanism. *J Biol Chem* 2002; **277**: 31768–31773.
31. Bardelli A, Longati P, Williams TA, Benvenuti S, Comoglio PM. A peptide representing the carboxyl-terminal tail of the met receptor inhibits kinase activity and invasive growth. *J Biol Chem* 1999; **274**: 29274–29281.
32. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2003; **10**: 76–100.
33. Yang JY, Widmann C. Antiapoptotic signaling generated by caspase-induced cleavage of RasGAP. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 5346–5358.
34. Yang JY, Michod D, Walicki J, Murphy BM, Kasibhatla S, Martin SJ *et al*. Partial cleavage of RasGAP by caspases is required for cell survival in mild stress conditions. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 10425–10436.
35. Yang JY, Michod D, Walicki J, Widmann C. Surviving the kiss of death. *Biochem Pharmacol* 2004; **68**: 1027–1031.
36. Paumelle R, Tulasne D, Kherrouche Z, Plaza S, Leroy C, Reveneau S *et al*. Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene* 2002; **21**: 2309–2319.
37. Stennicke HR, Salvesen GS. Caspases: preparation and characterization. *Methods* 1999; **17**: 313–319.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)

A



B



C- Résultats complémentaires

1) Une étiquette GFP pour étudier le clivage C-terminal

Deux stratégies avaient été mises en place pour détecter le clivage C-terminal de Met, la première tirait parti des capacités d'un anticorps à détecter l'extrémité C-terminale de Met et a permis de suivre le clivage de manière endogène. La seconde a consisté à utiliser des chimères Trk-Met étiquetées en C-terminal par une protéine de masse moléculaire importante. La protéine GFP (Green Fluorescence Protein) a été choisie car, en plus d'avoir un poids de 30 kDa, elle permettait de contrôler les transfections par l'utilisation de microscope à fluorescence (voir Figure 18). Cette stratégie devait permettre de suivre le clivage C-terminal en visualisant la diminution du poids du récepteur en Western-Blot. Dans un premier temps, j'ai transfecté des plasmides exprimant la GFP seule, le récepteur chimérique sauvage (Trk-Met_{WT}-GFP) et la forme mutée en C-terminal (Trk-Met_{D1374N}-GFP). J'ai vérifié par microscopie à fluorescence l'expression de ces trois protéines dans les cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney cell), des cellules épithéliales polarisées. La GFP est détectée dans l'ensemble de la cellule tandis que les deux chimères sont visualisées autour du noyau et à la membrane. Ces localisations correspondent à nos attentes puisque les chimères Trk-Met sont des récepteurs membranaires. L'observation de la fluorescence autour du noyau provient vraisemblablement de la maturation des récepteurs dans le réticulum endoplasmique

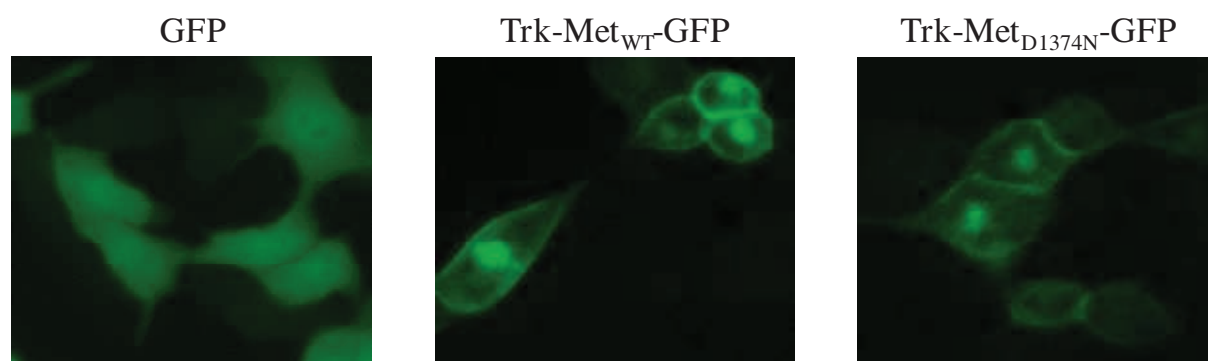


Figure 18: MDCK transfectées par les Trk-Met étiquetés par la GFP

Les cellules MDCK sont transfectées par les plasmides GFP, Trk-Met_{WT}-GFP et Trk-Met_{D1374N}-GFP et visualisées par microscopie à fluorescence.

Après transfection transitoire, les tailles des différentes constructions ont été observées en Western-Blot avec un anticorps dirigé contre le domaine kinase (voir Figure 19). Le récepteur Trk-Met sans étiquette (Trk-Met_{WT}) a été utilisé en témoin et a été observé en doublet à 140 et à 190 kDa, correspondant respectivement à la forme immature (non glycosylée) et mature (glycosylée). Quant aux deux constructions Trk-Met-GFP, elles ont également été observées en doublet à 180 et 230 kDa, l'augmentation du poids des chimères correspondant à l'ajout de la GFP.

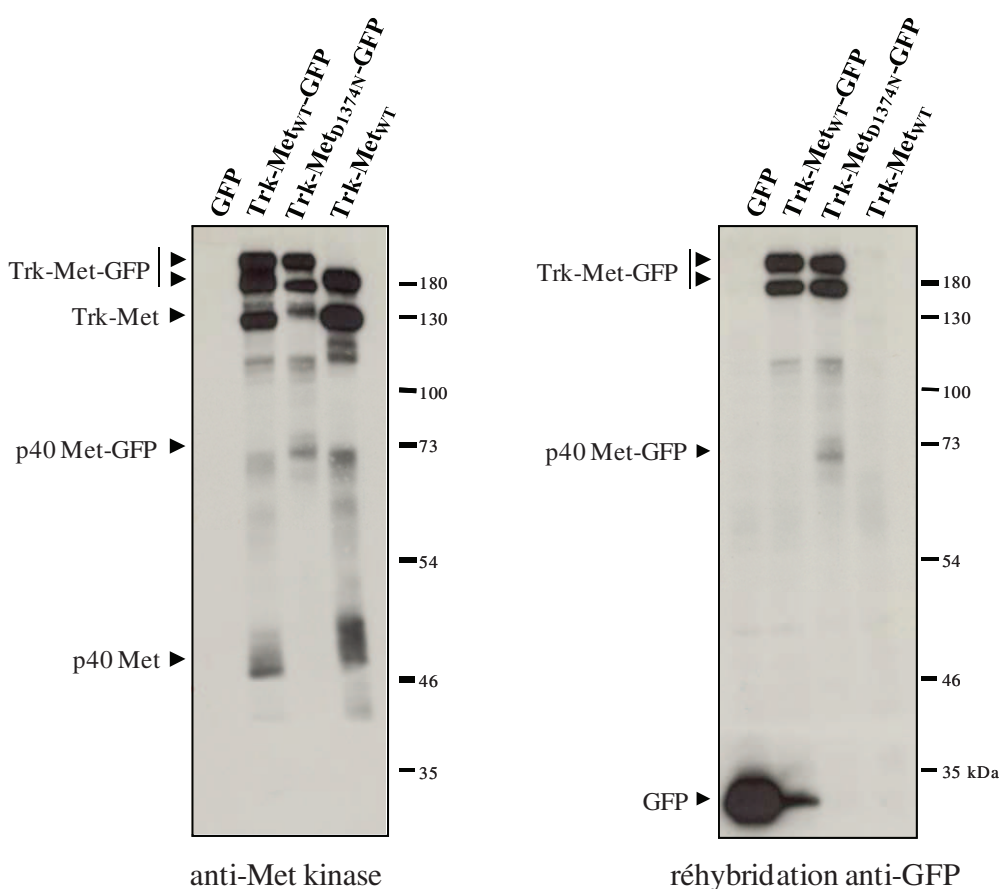


Figure 19: Western-Blot des cellules MDCK exprimant les Trk-Met étiquetés par la GFP

Les cellules MDCK ont été transfectées par les plasmides GFP, Trk-Met_{WT}-GFP, Trk-Met_{D1374N}-GFP et Trk-Met_{WT}. Les extraits cellulaires ont été déposés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Les protéines ont été révélées par Western-Blot avec les anticorps spécifiés.

Le récepteur Trk-Met_{WT}-GFP a généré deux bandes supplémentaires à 40 et 140 kDa. La première correspond à p40 Met et la seconde au récepteur ayant perdu la GFP. Les différentes observations ont été confirmées avec l'anticorps dirigé contre la GFP. Comme attendu, la protéine GFP seule a été détectée à 30 kDa et les Trk-Met-GFP ont été détectés à

180 et 230 kDa. De plus, p40 Met et le récepteur sans GFP n'ont plus été observés et j'ai distingué le fragment GFP libéré par le clivage C-terminal. Le récepteur Trk-Met_{WT}-GFP a donc été clivé en C-terminal et en juxtamembranaire.

J'ai également détecté un fragment à 70kDa avec les récepteurs Trk-Met_{D1374N}-GFP, correspondant à un p40 Met-GFP. La mutation inhibe donc bien le clivage C-terminal mais il permet toujours le clivage juxtamembranaire. Cependant la faible présence de ce fragment (uniquement visible avec l'anticorps dirigé contre la GFP) suggère une diminution du clivage juxtamembranaire par la présence de l'extrémité C-terminale. Cette observation est cohérente avec les résultats obtenus sur le récepteur Trk-Met_{D1374N} décrits dans la **Publication 2**.

Les premières conclusions de cette expérience sont que notre stratégie de suivi des clivages est efficace mais que la transfection transitoire semble induire les clivages des deux Trk-Met-GFP.

J'ai alors reproduit cette expérience en y ajoutant un inhibiteur dirigé contre l'ensemble des caspases, le Z-VAD-fmk (N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me) fluoromethyl ketone), ou en effectuant un traitement apoptotique avec de l'anisomycine (un inducteur d'apoptose qui induit JNK (c-Jun N-terminal Kinase) tout en inhibant la synthèse protéique) (voir Figure 20). Sans traitement, j'ai confirmé les résultats observés dans la figure 19. Le traitement par le Z-VAD-fmk inhibe les clivages caspases : le récepteur Trk-Met_{WT}-GFP a généré moins de récepteurs clivés en C-terminal et aucun p40 Met. L'inhibition a donc été efficace à la fois sur le clivage C-terminal et sur le clivage juxtamembranaire. Cependant, bien que diminuée, la GFP libérée par le clivage C-terminal est toujours observée. Ce clivage semble néanmoins très faible et témoigne de la grande sensibilité de notre stratégie pour suivre le clivage C-terminal. Quant à l'induction de l'apoptose, elle augmente l'ensemble des produits de clivage dus aux caspases.

Le récepteur Trk-Met_{WT}-GFP est donc clivé en C-terminal et la mutation D1374N inhibe ce clivage. Cependant, cette stratégie n'a pas apporté plus d'information que l'utilisation de la chimère Trk-Met étiquetée en V5 si ce n'est de détecter l'extrémité C-terminale générée par le clivage caspase. L'utilisation d'anticorps dirigés contre l'extrémité C-terminale et le domaine kinase de Met a, elle, permis de détecter le clivage C-terminal du récepteur, la séquentialité des clivages par les caspases et la présence majoritaire de récepteurs écourtés lors de l'apoptose. Cette stratégie s'est donc révélée la plus informative et a été logiquement retenue pour figurer dans la **publication 2**.

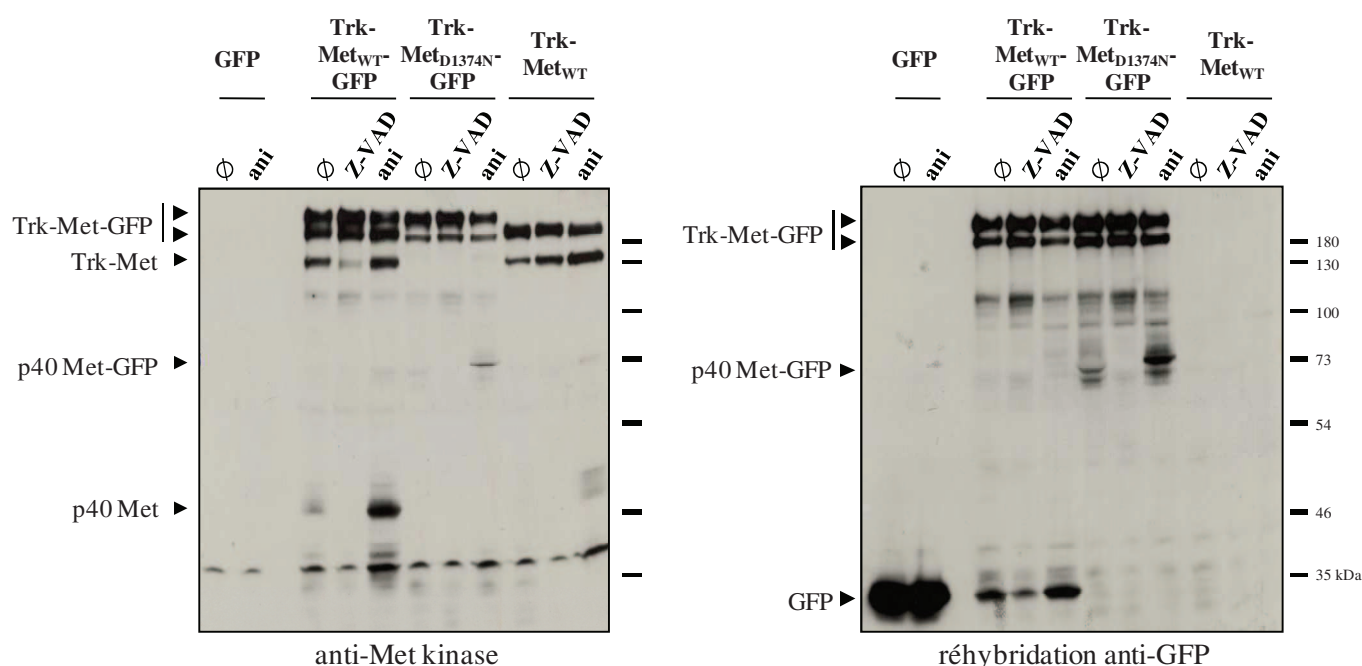


Figure 20: Traitements apoptotiques des cellules exprimant les Trk-Met étiquetés par la GFP

Les cellules MDCK ont été transfectées par les plasmides GFP, TRK-MET_{WT}-GFP, TRK-MET_{D1374N}-GFP et TRK-Met WT. Après déplétion en serum sur la nuit, les cellules ont été traitées 10h au Z-VAD-fmk (20mM) ou à l'anisomycine (50mM) avant d'être lysées. Les extraits cellulaires ont été déposés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Les protéines ont été révélées par Western-Blot avec les anticorps spécifiés.

2) Rôle de la forme écourtée du récepteur Met

a) Hypothèses de travail

Lors de la mort cellulaire, le clivage C-terminal favorise le clivage juxta-membranaire et potentialise l'action pro-apoptotique du fragment p40-Met. Durant ce processus, j'ai pu mettre en évidence que le nombre de récepteurs Met écourtés dépasse le nombre de récepteurs pleine longueur. En sachant que le récepteur écourté possède l'intégralité de ses domaines fonctionnels, à savoir le domaine de reconnaissance au ligand, le domaine kinase et le site de recrutement multi-substrats, j'ai envisagé que le récepteur Met écourté soit toujours capable de répondre à son ligand.

Notre hypothèse est que le récepteur écourté par le clivage C-terminal et le fragment p40 Met généré par clivage juxtamembranaire puissent avoir des conséquences différentes sur l'apoptose. Un exemple qui appuie cette possibilité est celui de RasGAP (Ras GTPase Activating Protein) capable d'inactiver Ras-GTP, l'initiateur de la voie des MAPKinases, en favorisant sa conversion en Ras-GDP. Lors de l'apoptose, RasGAP subit plusieurs clivages caspase dont les fonctions sont opposées. Dans un contexte de stress modéré, un premier clivage par la caspase-3 génère un fragment N-terminal capable de favoriser la survie en activant Akt (Yang et al., 2004). Si le stress cellulaire s'accroît, ce fragment N-terminal est clivé une seconde fois et génère deux fragments qui favorisent alors la mort de la cellule (Yang and Widmann, 2001).

D'autres données sur les RTK renforcent l'hypothèse d'une influence du clivage C-terminal sur les fonctions du récepteur. En effet, les extrémités C-terminales sont connues pour réguler l'activité des RTK. Ainsi, la perte de l'extrémité C-terminale de VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor 2) inhibe les capacités de recrutement et les réponses biologiques du récepteur (Meyer et al., 2004). Inversement, la délétion des extrémités C-terminales des récepteurs Tie2, CSFR (granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor), ErbB2, RON (Récepteur d'Origine Nantais), PDGF β R (Platelet-Derived Growth Factor β Receptor) et FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1) induit une augmentation de l'activité kinase en réponse au ligand voire une activation constitutive (Akiyama et al., 1991; Chiara et al., 2004; Niu et al., 2002; Sorensen et al., 2006; Woolford et al., 1988; Yokoyama et al., 2005).

Il est donc possible que le clivage C-terminal modifie l'action de Met notamment en réponse à l'HGF/SF. Tout comme le VEGFR2, le récepteur écourté pourrait perdre toute capacité de réponse au ligand et ainsi privilégier la mort cellulaire. Le clivage C-terminal pourrait également diminuer le nombre de protéines recrutées et donc privilégier certaines réponses biologiques. A l'inverse, l'extrémité C-terminale est peut-être un domaine inhibiteur et sa perte pourrait augmenter les capacités catalytiques du domaine kinase. Pour vérifier le rôle du clivage C-terminal en présence ou en absence de ligand, j'ai comparé plusieurs réponses biologiques de cellules épithéliales exprimant des récepteurs sauvages ou tronqués de leur extrémité C-terminale.

b) Le clivage C-terminal ne modifie pas les réponses au ligand

Afin d'étudier les réponses biologiques du récepteur Met écourté, j'ai utilisé une construction Trk-Met sauvage (Trk-Met_{WT}). En présence du ligand de TrkA, le Nerve Growth Factor (NGF), la chimère induit les réponses biologiques de Met sans activer le récepteur Met endogène. Pour étudier le rôle du clivage C-terminal, un codon stop a été inséré dans la partie Met de la chimère afin de recréer un récepteur écourté de son extrémité C-terminale (Trk-Met écourté). Les domaines de Met utilisés proviennent de récepteurs humains afin de pouvoir s'assurer de la présence ou non de l'extrémité C-terminale grâce aux anticorps dirigés contre ce domaine. Les tests ont été réalisés sur des cellules MDCK, des cellules épithéliales sur lesquelles l'HGF/SF est capable d'induire de nombreuses réponses biologiques *via* le récepteur Met endogène. J'ai alors sélectionné différents clones exprimant stablement les chimères écourtées de manière satisfaisante. Cependant, cela n'a pas été le cas pour les récepteurs Trk-Met_{WT} (voir Figure 21). En effet, nous n'avons pu obtenir que des récepteurs dont l'expression était assez faible malgré de nombreuses tentatives ; un résultat d'autant plus surprenant que le protocole est éprouvé et que nous avons auparavant réussi à obtenir des cellules MDCK exprimant des taux satisfaisants de récepteurs Trk-Met_{WT} d'origine murine. Malgré leur différence d'expression, les cellules Trk-Met_{WT} et Trk-Met écourté ont été utilisées pour tester l'induction de réponses biologiques suite à une stimulation par le NGF. Pour chaque réponse, deux clones ont été testés par type de chimère et ont présenté des résultats similaires, un seul clone est donc présenté dans la suite des travaux.

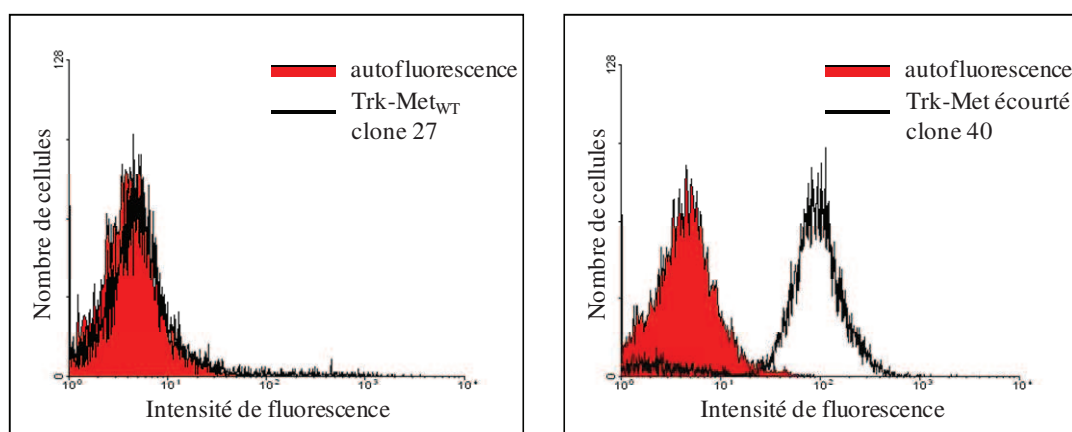


Figure 21: Expressions membranaires des cellules Trk-Met_{WT} et Trk-Met écourté dans les cellules MDCK

Les cellules MDCK exprimant stablement les récepteurs Trk-Met_{WT} et Trk-Met écourté ont été marquées avec un anticorps dirigé contre la partie extracellulaire TrkA et couplé à la phycoérythrine. La fluorescence a été analysée par cytométrie de flux

Dans un premier temps, j'ai comparé les réponses de dispersion entre les récepteurs Trk-Met_{WT} et Trk-Met écourté (voir Figure 22). Cultivées à une faible densité, les cellules MDCK forment des îlots resserrés alors qu'en réponse à l'HGF/SF, celles-ci sont capables de se dissocier et de se disperser. En absence de ligand, les cellules exprimant les récepteurs Trk-Met_{WT} et Trk-Met écourté ont formé des îlots resserrés, comme les cellules MDCK contrôles. En présence de NGF, les cellules contrôles sont restées en îlots alors que les chimères sauvages et écourtées se sont dispersées chacune efficacement. L'utilisation d'HGF/SF a montré que les trois lignées de cellules se sont dispersées de manière équivalente suite à l'activation du récepteur Met endogène. Cette expérience a démontré que le clivage C-terminal n'inhibe pas la réponse de dispersion.

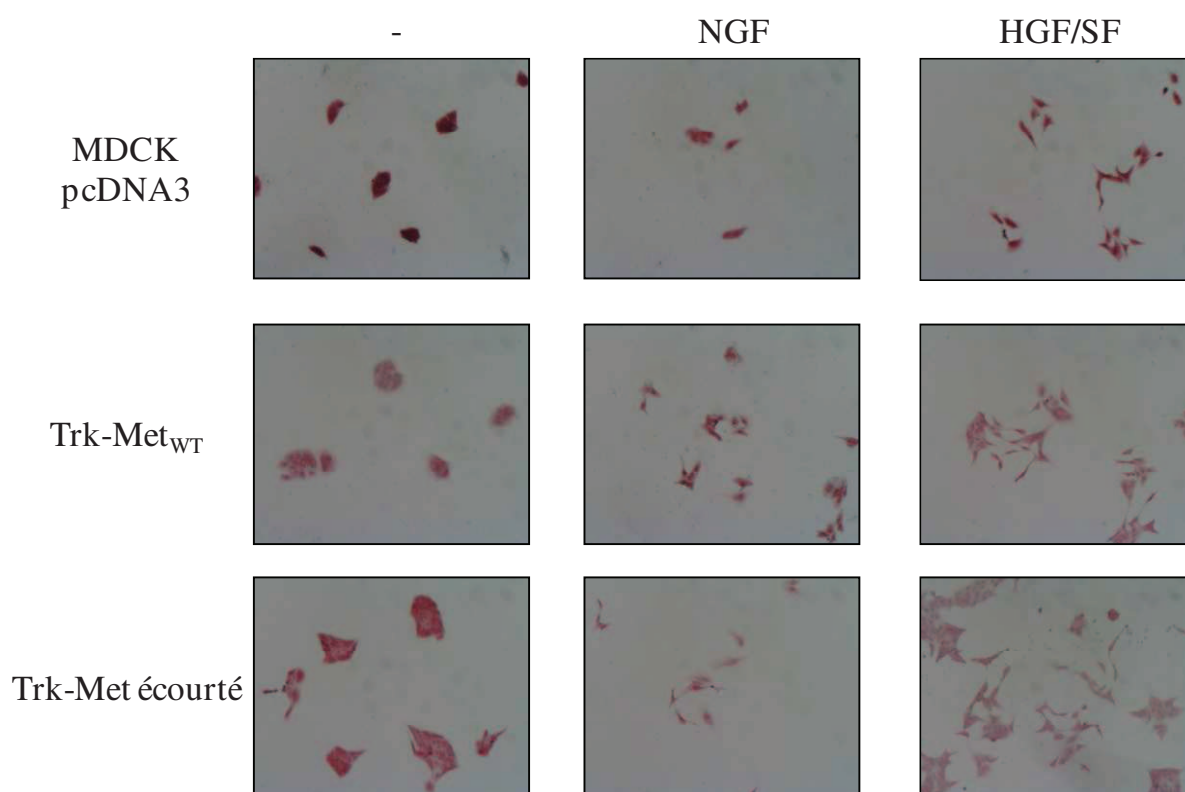


Figure 22: Réponses de dispersion dans les cellules MDCK exprimant Trk-Met_{WT} et Trk-Met écourté

Les cellules MDCK ont été stablement transfectées par les plasmides pcDNA3 « vide », TRK-Met_{WT} et TRK-Met écourté puisensemencées à faible densité. Après 24H, les cellules ont été traitées au NGF (100ng/ml) ou à l'HGF/SF (10ng/ml).

Les deux lignées cellulaires exprimant les chimères Trk-Met ont également été ensemencées dans une matrice de matrigelTM (voir Figure 23). Le matrigelTM est une matrice mimant la membrane basale, il est composé de laminine, de collagène IV et d'héparane sulfate. Les cellules ensemencées dans cette matrice peuvent former des structures organisées en réseau en réponse à l'HGF/SF, il s'agit d'une réponse de morphogénèse. Les cellules non traitées se sont regroupées en petits cystes. Par contre, en présence de NGF, les cellules exprimant les Trk-Met_{WT} et Trk-Met écourté ont formé des structures en réseau. L'HGF/SF a induit une réponse de morphogénèse dans les deux lignées cellulaires. Les récepteurs Trk-Met_{WT} et Trk-Met écourté sont donc tous deux capables d'induire des réponses de morphogénèse.

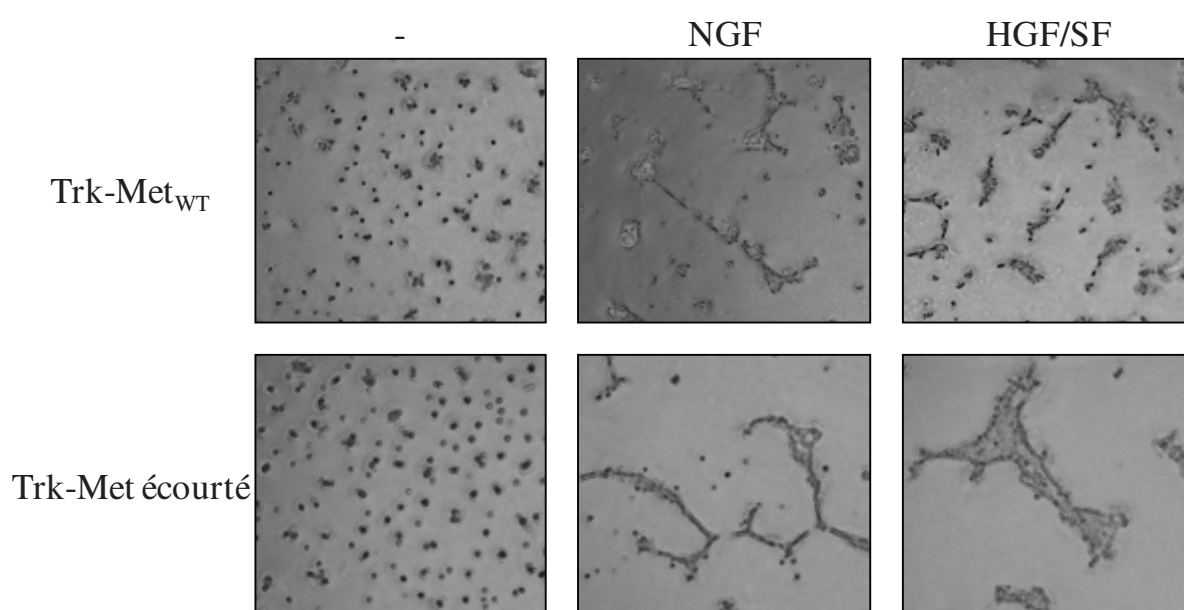


Figure 23: Réponses de morphogénèse dans les cellules MDCK exprimant Trk-Met_{WT} et Trk-Met écourté

Les cellules MDCK exprimant Trk-Met_{WT} et Trk-Met écourté ont été ensemencées dans du matrigelTM. Après 24h, les cellules ont été traitées par du NGF (100ng/ml) ou de l'HGF/SF (10ng/ml).

J'ai ensuite transfecté les deux constructions dans des fibroblastes NIH-3T3 (voir Figure 24). Une fois à confluence, le contact des cellules entre elles inhibe leur prolifération, ce phénomène est appelé inhibition de contact. Quand un oncogène s'exprime dans ces cellules, il lève l'inhibition de contact et les fibroblastes se superposent en foyers visibles à l'œil nu. Sans NGF, les fibroblastes transfectés ont formé peu de foyer. Ainsi, les récepteurs Trk-Met_{WT} et Trk-Met écourtés ne semblent pas transformants en l'absence de leur ligand. En revanche, en présence de NGF, les fibroblastes transfectés par les Trk-Met_{WT} et les Trk-Met

écourté ont formé de nombreux foyers. Ces deux constructions ont donc un caractère transformant en présence de leur ligand. Comme le nombre de foyer est équivalent, les récepteurs Trk-Met_{WT} et les Trk-Met écourtés semblent avoir des capacités transformantes similaires.

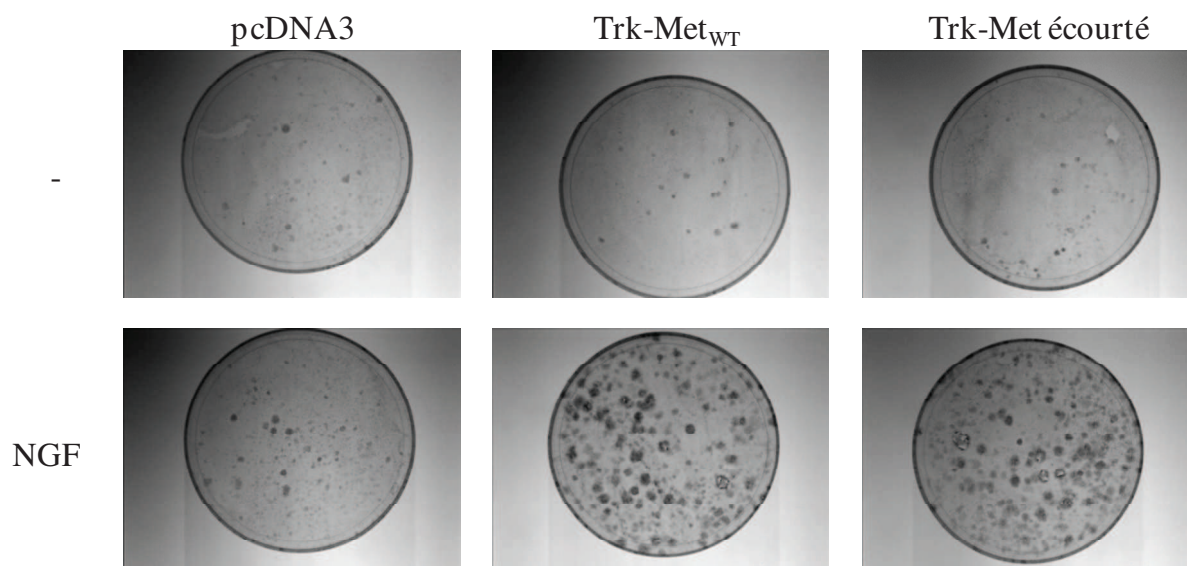


Figure 24: Réponses de transformation de fibroblastes NIH-3T3 exprimant Trk-Met_{WT} et Trk-Met écourté

Les fibroblastes NIH-3T3 ont été transfectés par les plasmides pcDNA3, TRK-Met_{WT} et TRK-Met écourté. A confluence, les cellules ont été appauvries en serum (0,5%FBS (Fetal Bovine Serum)) puis traitées ou non au NGF (100ng/ml). Après 2 semaines, les cellules ont été fixées au bleu trypan.

Après l'étude des réponses de dispersion et de morphogenèse, il semble que les récepteurs privés de leur extrémité C-terminale répondent au ligand de manière aussi efficace que les récepteurs sauvages. De plus, les récepteurs Trk-Met_{WT} et Trk-Met écourté transforment de façon équivalente les fibroblastes NIH-3T3. Ainsi, le récepteur écourté ne présente pas d'activité constitutive capable d'induire des réponses biologiques. En réponse au ligand, le clivage C-terminal ne semble donc pas modifier l'ensemble des fonctions biologiques du récepteur Met.

Les réponses biologiques induites par les récepteurs Trk-Met_{WT} et Trk-Met écourté ont été comparées alors que les expressions de ces récepteurs dans les cellules MDCK sont très différentes, ces résultats doivent donc être pris avec précaution. Il semble néanmoins que le clivage C-terminal n'active pas constitutivement le récepteur et qu'il n'abolit pas non plus les réponses de Met au ligand. Le récepteur Met écourté serait donc toujours fonctionnel.

Cependant, pour conclure plus finement sur les différences dans les réponses biologiques que sont capables d'induire le récepteur Trk-Met écourté par rapport au récepteur Trk-Met_{WT}, il serait nécessaire d'obtenir des expressions similaires des deux chimères dans de nouvelles expériences. Il est notamment possible que l'intensité des réponses biologiques induites par le récepteur Trk-Met_{WT} soit sous-évaluée puisque son expression est très faible. Cependant, cette hypothèse est peu probable puisque les réponses au NGF des récepteurs Trk-Met sont très similaires aux réponses à l'HGF/SF sur les récepteurs endogènes, suggérant des réponses proches de l'optimum.

D- Discussion

Le récepteur Met est un facteur de survie en présence de son ligand mais un amplificateur de mort en son absence. La fonction pro-apoptotique de Met est portée par p40 Met, un fragment intracellulaire cytosolique généré par deux clivages séquentiels dus aux caspases. Le premier clivage est situé dans l'extrémité C-terminale du récepteur au début de l'apoptose. Le second se situe dans le domaine juxtamembranaire intracellulaire et a lieu alors que l'apoptose est plus avancée.

1) Séquentialité des clivages caspase de Met

J'ai démontré que le clivage C-terminal par les caspases a lieu plus rapidement que le clivage juxtamembranaire, suggérant que différentes caspases sont impliquées dans ces clivages. Parmi les caspases testées *in vitro*, seule la caspase-3 a été capable de cliver le récepteur Met sur les sites juxtamembranaire et C-terminal (Ancot et al., 2009; Tulasne et al., 2004). Cependant, l'absence de caspase-3 dans les cellules MCF7 (Michigan Cancer Foundation 7) prévient effectivement le clivage juxtamembranaire mais pas le clivage C-terminal de Met. De plus, l'inhibition spécifique de la caspase-3 n'abolit que le clivage juxtamembranaire tandis qu'un inhibiteur dirigé contre l'ensemble des caspases empêche également le clivage C-terminal. L'extrémité C-terminale de Met semble donc clivée par plusieurs caspases alors que le domaine juxtamembranaire n'est clivé que par la caspase-3.

La sensibilité des deux clivages pourrait provenir des séquences mises en jeu. En effet, la séquence juxtamembranaire (ESVD) est moins consensuelle que la séquence C-terminale de type DxxD, cette dernière pouvant également être doublée (DNID chez la souris, DNADDEVD chez le chimpanzé et l'humain). Il est donc possible qu'une faible activation de la caspase-3 ou qu'un large panel de caspases clive efficacement Met sur son extrémité C-

terminale. En revanche, le clivage juxtamembranaire ne serait possible que lorsque l'activité de la caspase-3 est plus importante, p40 Met serait alors généré et amplifierait la mort cellulaire.

2) Le clivage C-terminal convertit Met en récepteur à dépendance ?

Durant le laps de temps séparant les deux clivages, la majorité des récepteurs Met sont clivés en C-terminal. Or les récepteurs écourtés conservent le domaine kinase ainsi que le site de recrutement multi-substrats du récepteur. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'en présence d'HGF/SF ces récepteurs soient toujours capables d'induire des réponses biologiques. Malgré les difficultés à comparer les récepteurs Trk-Met_{WT} et Trk-Met écourté, il semble que les réponses induites par les deux récepteurs soient comparables, aussi le clivage C-terminal n'inhiberait, ni n'avantagerait les réponses biologiques induites par le récepteur Met. Un regret subsiste néanmoins quant aux capacités de réponse de survie du Met écourté. Il aurait été intéressant de savoir si, lors de l'apoptose, un récepteur écourté aurait agi différemment d'un récepteur pleine longueur. Cependant cette expérience n'est pas réalisable en l'état car elle pose différents problèmes. En effet, le récepteur sauvage aurait été clivé en C-terminal par les caspases et serait devenu un récepteur Met écourté. Pour y remédier, j'aurais pu utiliser un récepteur non-clivable en C-terminal mais il aurait défavorisé la génération de p40 Met et faussé la réponse de survie. L'impact du seul clivage C-terminal de Met dans la réponse de survie est donc très difficile à étudier.

Privé de son extrémité C-terminale, Met possède encore l'ensemble de ses domaines fonctionnels et semble conserver toutes ses capacités de réponse à l'HGF/SF. En condition apoptotique, le récepteur écourté, présent majoritairement, pourrait permettre la survie cellulaire si le ligand est présent. En revanche, sans ligand, le récepteur Met écourté est clivé dans son domaine juxtamembranaire et permet la formation de p40 Met. Ainsi, le récepteur écourté perd sa capacité de signalisation au profit de sa capacité apoptotique permettant d'amplifier la mort cellulaire. Les fonctions de survie et d'apoptose du Met écourté dépendraient donc directement de la présence ou non d'HGF/SF, des fonctions antagonistes caractéristiques des récepteurs à dépendance. Le clivage C-terminal renforcerait donc les caractéristiques de récepteur à dépendance du récepteur Met.

De manière intéressante, les récepteurs à dépendance comme DCC, Ret, TrkC ou les récepteurs aux éphrines sont impliqués dans la survie de cellules lors du développement (Goldschneider and Mehlen). De la même façon, il est envisageable que des cellules

exprimant Met dépendent de la présence d'HGF/SF. Ainsi des motoneurones du tube neural expriment Met et leur survie dépend de leur migration vers les bourgeons de membres où s'exprime l'HGF/SF. Les motoneurones présents dans les bourgeons de membres permettent alors d'innervier les muscles squelettiques (Maina et al., 1997). Dans ce contexte, il est possible que les motoneurones non stimulés par le ligand meurent à cause de l'action pro-apoptotique de Met. Le même mécanisme pourrait être impliqué dans la migration des myoblastes vers les bourgeons de membres ou de neurones vers l'hippocampe (Bladt et al., 1995; Martins et al., 2007). Afin de savoir si les clivages caspases de Met ont effectivement un rôle physiologique, un projet visant à générer des souris KI Met non clivable par les caspases a été initié. L'obtention de ces souris et l'étude de leur développement devraient nous en apprendre plus la dépendance de Met à l'HGF/SF.

II- Dégradation de Met par le PS-RIP

A- Contexte de l'étude

Durant les études menées sur les clivages caspases de Met, il avait été observé que l'utilisation d'inhibiteur du protéasome permettait la stabilisation de fragments à 50 et 55 kDa (Fig.1). Le protéasome étant une structure dédiée à la dégradation de protéines, il semblait probable que ces fragments soient des intermédiaires de la dégradation de Met, ce qu'aucune étude n'avait démontré jusqu'alors. Afin d'en savoir plus sur les mécanismes impliqués, un rapide calcul, basé sur la taille de ces fragments, a été réalisé ; il suggérait l'existence d'un premier clivage dans la région extracellulaire proche de la membrane et d'un deuxième dans le domaine transmembranaire du récepteur. Ces deux sites potentiels de clivage n'étaient pas sans rappeler le processus du PS-RIP (voir l'introduction). Bénédicte Foveau (en thèse à cette époque) avait donc entamés une série de travaux afin de vérifier que Met était une cible du PS-RIP.

B- Résumé de l'étude et rôle du PS-RIP de Met

Il a été démontré que Met est élagué par des métalloprotéases : le fragment N-terminal de Met (Met-NTF) est alors libéré dans le milieu extracellulaire tandis que le fragment C-terminal (Met-CTF) reste ancré à la membrane (Fig.3). Le Met-CTF est alors clivé par le complexe γ -secrétase et le domaine intracellulaire de Met (Met-ICD) généré est rapidement

dégradé par le protéasome (Fig.2). Il a également été montré que ce mécanisme est indépendant d'une stimulation par l'HGF/SF (Fig.5).

Ces données confirmaient que le PS-RIP était impliqué dans la dégradation de Met en absence de ligand. Cependant, les conséquences de cette dégradation sur les fonctions de Met restaient inconnues. C'est à ce stade de l'étude que j'ai pris en charge le projet avec la collaboration de Catherine Leroy (Assistante Ingénieur).

Afin d'évaluer les conséquences de cette dégradation, nous avons choisi d'élaborer des récepteurs Trk-Met clivables ou non, une stratégie dont l'efficacité avait été démontrée lors des travaux sur les clivages caspases de Met. Le récepteur Trk-Met comprend la partie extracellulaire de TrkA. Or nous avons montré que TrkA n'est pas clivable par l'élagage, cette chimère ne peut donc être dégradée par le PS-RIP. Nous l'avons donc baptisée Trk-Met non clivable. De manière à restaurer l'élagage dans cette chimère, nous avons ajouté 50 acides aminés du domaine extracellulaire de Met entre le domaine transmembranaire de Met et le domaine extracellulaire de TrkA. Ces 50 aa supplémentaires correspondent à la zone où le récepteur Met pourrait être élagué compte tenu de la taille du fragment à 55kDa. Nous espérons ainsi créer une chimère Trk-Met clivable par le PS-RIP (Fig.6).

La comparaison entre ces deux récepteurs a montré que le récepteur Trk-Met clivable était effectivement dégradé par le PS-RIP contrairement au récepteur Trk-Met non clivable. De plus, nous avons mis en évidence que le récepteur clivable avait une durée de demi-vie beaucoup plus courte que le récepteur non-clivable (Fig.6). Cette différence de stabilité modifie le comportement des deux types de chimères. En effet, nous avons observé par immunofluorescence et en cytométrie de flux que les récepteurs non clivables étaient beaucoup plus présents à la membrane plasmique. Cette accumulation engendre même la phosphorylation du domaine kinase de ces récepteurs en absence de ligand (Fig.7). Nous avons ensuite comparé les réponses biologiques des récepteurs clivable et non clivable. En présence de NGF, le ligand de TrkA, les réponses de dispersion, de migration et de morphogenèse sont très efficaces dans les lignées cellulaires exprimant les Trk-Met clivable et non-clivable. Le PS-RIP ne semble donc pas modifier les réponses au ligand (Fig.8). En revanche, en absence de ligand, nous avons observé que les cellules exprimant les récepteurs non clivables présentaient des réponses de dispersion et de morphogenèse basales. Cette activité en absence de ligand est particulièrement claire dans la réponse de migration où les cellules exprimant la chimère non-clivable sont capables de traverser une membrane

microporée. Ces résultats indiquent que la perte de la dégradation PS-RIP du récepteur Met permet son activation en absence de ligand ce qui conduit à l'induction de réponses biologiques. Ce mécanisme de régulation de Met serait donc primordial pour réguler l'activité du récepteur.

Au cours de ces travaux, une équipe italienne a démontré qu'un anticorps dirigé contre la partie extracellulaire de Met, le DN30, était capable de dégrader le récepteur en induisant son élagage. Nous nous sommes alors rapprochés de Silvia Giordano et Annalisa Petrelli. Ainsi, nous avons pu montrer que l'élagage induit par le DN30 permet la génération de Met-NTF, Met-CTF et de Met-ICD ce qui prouve que l'anticorps induit le PS-RIP du récepteur Met (Fig.9). L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication (voir **Publication 3**).

Publication 3 : Down-regulation of the Met receptor tyrosine kinase by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis

Foveau B, Ancot F, Leroy C, Petrelli A, Reiss K, Vingtdeux V, Giordano S, Fafeur V, Tulasne D.

Mol Biol Cell. 2009 May;20(9):2495-507. Epub 2009 Mar 18.

Down-Regulation of the Met Receptor Tyrosine Kinase by Presenilin-dependent Regulated Intramembrane Proteolysis

Bénédicte Foveau,* Frédéric Ancot,* Catherine Leroy,* Annalisa Petrelli,[†] Karina Reiss,[‡] Valérie Vingtdoux,[§] Silvia Giordano,[†] Véronique Fafeur,* and David Tulasne*

*CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille-Institut Pasteur de Lille-Université de Lille 1-Université de Lille 2, 59021 Lille cedex, France; [†]Division of Molecular Oncology, Institute for Cancer Research and Treatment (IRCC), University of Turin Medical School, 10060 Candiolo, Italy; [‡]Biochemical Institute, Christian-Albrecht-University, D-24098 Kiel, Germany; and [§]INSERM U837, Centre Jean-Pierre Aubert, Université de Lille 2 and IMPRT, Neurodegenerative Disorders and Neuronal Death, F-59045 Lille, France

Submitted September 23, 2008; Revised January 30, 2009; Accepted March 3, 2009
Monitoring Editor: Carl-Henrik Heldin

Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) acts through the membrane-anchored Met receptor tyrosine kinase to induce invasive growth. Deregulation of this signaling is associated with tumorigenesis and involves, in most cases, overexpression of the receptor. We demonstrate that Met is processed in epithelial cells by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis (PS-RIP) independently of ligand stimulation. The proteolytic process involves sequential cleavage by metalloproteases and the γ -secretase complex, leading to generation of labile fragments. In normal epithelial cells, although expression of cleavable Met by PS-RIP is down-regulated, uncleavable Met displayed membrane accumulation and induced ligand-independent motility and morphogenesis. Inversely, in transformed cells, the Met inhibitory antibody DN30 is able to promote Met PS-RIP, resulting in down-regulation of the receptor and inhibition of the Met-dependent invasive growth. This demonstrates the original involvement of a proteolytic process in degradation of the Met receptor implicated in negative regulation of invasive growth.

INTRODUCTION

The Met receptor tyrosine kinase is expressed predominantly in cells of epithelial origin and is activated by its stromal ligand, the hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF). Met activation stimulates proliferation, scattering, invasion, morphogenesis, and survival of epithelial cells. The ligand-stimulated Met receptor furthermore acts as an angiogenic factor in endothelial cells and has chemoattractant and neurotrophic activities in various types of neurons (Birchmeier *et al.*, 2003). The biological program triggered by ligand-stimulated Met has been named invasive growth and instructs cells to dissociate, migrate, degrade the surrounding matrix, proliferate, and survive (Comoglio *et al.*, 2008). Targeted disruption of either the *hgf* or the *met* gene highlights the essential role of the HGF/SF-Met system during development of the placenta, liver, muscles, and neurons (Bladt *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1995; Uehara *et al.*, 1995; Maina *et al.*, 1997). HGF/SF and Met also play a role in adults in regulating mammary gland development (Yant *et al.*, 1998) and renal (Kawaida *et al.*, 1994) or liver regeneration (Borowiak *et al.*, 2004).

Met is synthesized from a single-chain precursor that undergoes posttranslational glycosylation and endoproteolytic cleavage to produce the mature heterodimeric membrane form (Giordano *et al.*, 1989). Mature Met is a type I transmembrane protein composed of an entirely extracellular 45-kDa α subunit disulfide-linked to a 145-kDa β subunit shared between the extra- and intracellular compartments and containing the catalytic domain (Giordano *et al.*, 1989). On ligand binding and subsequent dimerization of Met, several tyrosine residues in the intracellular region of the β subunit become phosphorylated. Within the tyrosine kinase domain, two tyrosines are the major autophosphorylation sites, and mutation of these residues abolishes the biological activity (Longati *et al.*, 1994). Outside the kinase domain, two autophosphorylation sites in the C-terminal region are responsible for recruitment of several proteins involved in initiation of intracellular signaling (Ponzetto *et al.*, 1994).

Aberrant Met and HGF/SF signaling is involved in promoting tumorigenesis and metastasis. In fact, the Met receptor was originally identified as an oncogene resulting from a chromosomal rearrangement and giving rise to a product where the dimerization domain of the translocated promoter region (TPR) is fused with the intracellular region of the Met receptor (Park *et al.*, 1986). A direct link between Met and cancer was later evidenced by characterization of receptor-activating mutations in hereditary papillary renal carcinoma (Schmidt *et al.*, 1997). Most often, activation of Met in cancer occurs through ligand-dependent stimulation, induced by uncontrolled expression of HGF/SF and/or Met, leading to

This article was published online ahead of print in *MBC in Press* (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E08-09-0969>) on March 18, 2009.

Address correspondence to: David Tulasne (david.tulasne@ibl.fr).

autocrine or paracrine activation (Birchmeier *et al.*, 2003). In addition, aberrant Met activation is induced by overexpression of the receptor without HGF/SF engagement: ligand-independent activation of receptor tyrosine kinases is typically observed in cells expressing high levels of receptor, leading to spontaneous dimerization and subsequent activation (Ponzetto *et al.*, 1991). Overexpression of Met is a consequence of various mechanisms such as gene amplification as in colorectal cancer (Di Renzo *et al.*, 1995), increased transcription induced by oncogenes (Gambardella *et al.*, 1996; Ivan *et al.*, 1997), or hypoxia (Pennacchietti *et al.*, 2003). Interference with Met activation appears as a challenging approach to hampering tumorigenic and metastatic processes mediated by Met and/or HGF/SF overexpression (Migliore and Giordano, 2008).

Down-regulation of the HGF/SF-activated receptor is an essential negative regulatory mechanism preventing receptor oversignaling. This down-regulation occurs through recruitment of the ubiquitin ligase c-Cbl, which promotes receptor ubiquitination and subsequent degradation (Petrilli *et al.*, 2002; Peschard *et al.*, 2004). Uncoupling of Met from c-Cbl-mediated ubiquitination, either through loss of the juxtamembrane domain, as in the oncogene TPR-Met, or by mutation of the tyrosine residue serving as a Cbl dock leads to cell transformation (Peschard *et al.*, 2001; Mak *et al.*, 2007).

Down-regulation of Met signaling also involves proteolytic cleavages. We have previously demonstrated that Met is cleaved by caspases, which separate the extracellular ligand-binding domain from the intracellular kinase domain. In addition to abolishing the ligand responsiveness of Met, these cleavages generate a cytoplasmic proapoptotic fragment named p40 Met, involved in apoptosis amplification (Tulasne *et al.*, 2004; Foveau *et al.*, 2007; Deheuninck *et al.*, 2008; Tulasne and Foveau, 2008). Many other fragments of Met have been described, but their biological functions, and the mechanisms involved in their generation have not been investigated. Examples include an extracellular fragment of Met, released upon ectodomain shedding into the culture supernatant (Prat *et al.*, 1991; Galvani *et al.*, 1995; Wajih *et al.*, 2002), and a labile 55-kDa intracellular fragment of Met produced in epithelial cells (Jeffers *et al.*, 1997).

In the present article we reveal sequential proteolytic cleavages of the full-length Met receptor by the presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis (PS-RIP). We demonstrate that PS-RIP is able to down-regulate Met receptor independently of ligand stimulation and as a consequence down-regulates Met-induced invasive growth.

MATERIALS AND METHODS

Cytokines, Drugs, and Cell Cultures

Human recombinant HGF/SF was purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ). Nerve growth factor (NGF) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). The proteasome inhibitors MG132 and ALLN were purchased from Calbiochem (San Diego, CA). The proteasome inhibitor lactacystin and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). The γ -secretase inhibitor E compound was purchased from Alexis/Coger (Lausen, Switzerland). The γ -secretase inhibitors L-685 458 (inhibitor X), DAPT and the γ -secretase inhibitor VI were purchased from Calbiochem. The matrix metalloproteinase inhibitors GM6001 and TAPI-1 were purchased respectively from Chemicon (Temecula, CA) and Calbiochem. The inhibitor of protein biosynthesis cycloheximide (CHX) was purchased from ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA). The Met kinase inhibitor SU11274 was purchased from Calbiochem.

Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells, epithelial cells from cervix carcinoma Henrietta Lacks (HeLa), human mammary adenocarcinoma cells MDA-MB231, and human gastric carcinoma cell line GTL16 cells were cultured in DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Invitrogen) and antibiotics. MCF-10A, human mammary

epithelial cells, spontaneously immortalized, were cultured in DMEM and HAM's F12 (Invitrogen; vol/vol) supplemented with 5% horse serum (HS, Invitrogen), 500 ng/ml hydrocortisone (Calbiochem), 20 ng/ml epidermal growth factor (Peprotech), 10 μ g/ml insulin (Sigma), and 100 ng/ml cholera toxin (Calbiochem). Murine embryonic fibroblast cells (MEFs), WT or deficient for presenilin 1 and/or presenilin 2, (PS1 and/or PS2) were kindly provided by Paul Saftig (Christian-Albrechts-Universität, Germany) and Bart de Strooper (VIB, the Flanders Institute for Biotechnology, Belgium) and were cultured in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% FCS and antibiotics. Cells were cultured at 37°C in a water-saturated 5% CO₂ atmosphere.

Antibodies

Mouse mAb directed against mouse Met (B-2) and rabbit polyclonal antibody directed against C-terminal region of human Met (C-12) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The mouse monoclonal antibodies 25H2 and 3D4 directed against the kinase domain of Met were purchased respectively from Cell Signaling Technology (Danvers, MA) and Zymed Laboratories (South San Francisco, CA). Antibodies directed against extracellular region of Met (clones DL-21 and DO-24) were purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). mAb against extracellular region of Met, used in flow cytometry, was purchased from R&D Systems. Antibody directed against phosphorylated tyrosine of the Met kinase domain was purchased from BioSource (Camarillo, CA). Rabbit polyclonal antibody against ADAM-17 was purchased from Millipore (Billerica, MA). Antibodies directed against ERK2 and β -actin were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Antibody directed against phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (ERK) was purchased from Cell Signaling Technology. Mouse mAb directed against extracellular domain of Met was previously described (Petrilli *et al.*, 2006). Peroxydase, fluorescein, and rhodamine-conjugated antibodies directed against rabbit and mouse IgG were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

Plasmid Constructions

The TRK-Met chimera expressing vector was constructed as follows. The original TRK-Met chimera cloned in pBAT vector, which allows expression of extracellular TRKA receptor fused to the transmembrane and cytoplasmic region of mouse Met (Weidner *et al.*, 1995), was cloned in pcDNA 3.1 plasmid (Invitrogen). The TRK sequence, up to the BamHI restriction site, was cut out by digestion using HindIII and BamHI restriction enzymes and cloned into pcDNA 3.1 plasmid. The remaining TRK-Met sequence, from the BamHI restriction site to the 3' end, was amplified by PCR using pBAT TRK-Met as a template and the following primers: 5' GCAGGCCGGCTGGATCCTCACAGAGCTGG 3' containing the BamHI restriction site and 5' GGTGGGCCTCTCGAGCATCATGTGTTC 3' containing the EcoRI restriction site. The PCR product was subcloned into a pGEM plasmid (pGEM Easy kit; Stratagene, La Jolla, CA). Finally, the remaining TRK-Met sequence was inserted in pcDNA3 TRK using BamHI and XhoI restriction sites. The TRK-Met-juxta, in which 50 amino acids of the extracellular juxtamembrane domain of mouse Met were added, was constructed as follows. The mouse Met sequence was amplified by PCR using pMB11 mouse Met as template (kindly provided by Dr. G. Vande Woude, Van Andel Research Institute, Grand Rapids, MI) and the following primers: 5' AAAATGTACTGGAATTCAAGGGAAATGATA 3' containing the EcoRI restriction site and 5' GCCTCTCGAGCATCATGTGTTCCTC 3' containing the XhoI restriction site. The PCR product was inserted in the pcDNA 3.1 containing the TRKA sequence using EcoRI and XhoI restriction sites.

The full-length human Met expressing vector was constructed as follows. The human Met sequence WT and K1108A (Kinase dead), previously described (Foveau *et al.*, 2007), were obtained by cutting out by digestion using EcoRI restriction enzyme from PRS2 hu Met (kindly provided by Dr. G. Vande Woude) and cloned into pCAGGS vector (kindly provided by Dr. P. Mehlen, Centre Léon Bérard, Lyon, France).

Western Blotting, Immunofluorescence, and Immunoprecipitation

Western blotting and immunofluorescence were performed as previously described (Foveau *et al.*, 2007). Results are representative of at least three experiments. For F-actin staining, cells were incubated with phalloidin-FITC (Molecular Probes, Eugene, OR). Cell nuclei were counterstained using Hoechst 33258. Cover slips were mounted with Glycergel mounting medium (Dako, Carpinteria, CA), and fluorescence was examined using a Zeiss Axio Imager Z1 (Thornwood, NY). For quantification of protein expression, luminescence was captured with a digital imaging using a cooled charge coupled device (CCD) camera (LAS 3000, Fuji, Tokyo, Japan), and quantification was performed using Multigauge V3.0 software. The background adjusted volume was normalized to empty well. For immunoprecipitation, cell supernatants were clarified by centrifugation (10 min, 20,800 $\times$ g) and precleared for 30 min at 4°C with protein A Sepharose 4B (GE Healthcare, Waukesha, WI). After centrifugation to remove beads (10 min, 20,800 $\times$ g, 4°C), the supernatant was incubated with the indicated antibody at 4°C overnight. The immune complex was collected with protein A Sepharose 4B at 4°C for 1 h. The beads

were washed four times with lysis buffer and boiled in Laemmli sample buffer.

Transfections

Transient transfections of MDCK cells were performed as previously described using the lipofection method (Tulasne *et al.*, 1999). For stable transfections of MDCK cells, 2 d after transfection, cells were split into four 100-mm dishes containing DMEM-10% FCS, and the next day the medium was supplemented with 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 (Invitrogen). Resistant clones were isolated after 10 d, and clones expressing the transfected constructs were selected by Western blot.

Small Interfering RNA

MCF10A cells were cultured (2×10^5 cells/well in six-well plates) in DMEM-10% FCS. The next day, cells were incubated for 6 h in serum-free OptiMEM, 5 μl transfectant (Lipofectamine 2000; Invitrogen), and 50 nM small interfering RNA (siRNA; Invitrogen) targeting the ADAM-17 (sequence 1: 5'-CCAGGGAGG-GAAUAUGUCAUGUAU-3' and sequence 2: 5'-GAGGAAAGGAAAGCCU-GUACAGUA-3') or a random sequence. The cells were rinsed in DMEM-10% FCS before further treatment.

Scattering Assay

Scattering from cell islets was performed as follows. MDCK cells (6×10^4 cells/well) were seeded onto six-well plates and cultured for 24 h in DMEM and 10% FCS, with or without 10 ng/ml HGF/SF or 100 ng/ml NGF. At the end of the experiments, cells were fixed and stained with Carazzi's hematoxylin and eosin, and their morphologies were examined by light microscopy.

Morphogenesis Assay

MDCK cells (4×10^4 cells/well) were plated on a layer of 300 μl of Matrigel (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) in 24-well plates in DMEM-10% FCS. The next day, cultures were treated or not with HGF/SF for 24 h. At the end of the experiments, cells were stained 10 min at 37°C with neutral red (0.5% wt/vol) and fixed with 4% paraformaldehyde, and their morphologies were examined by light microscopy.

Migration Assay

MDCK cells (1×10^5 cells/wells), treated or not with SU11274, were seeded in triplicates in invasion chambers (Transwell, BD Biosciences, San Jose, CA). The next day, HGF/SF or NGF were added in the lower compartment of the chamber. After 48 h, the filters were removed, and the cells on the lower

surface of the filter were stained with Hoechst. The total number of cells from five microscopic fields at 10 $\times$ magnification was counted from each filter.

Flow Cytometric Analysis

Cells were collected and washed in ice-cold PBS, 1% FCS. Cells were then incubated for 1 h with 25 ng/ml phycoerythrin-coupled antibody directed against the TRKA (R&D Systems) or 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antibody directed against extracellular domain of Met followed by incubation with 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fluorescein-conjugated anti-mouse IgG. Cells were analyzed by flow cytometry using an EPICS XL-MCL Coulter (Beckman, Fullerton, CA). Data were recorded with Expo II software and analyzed with Win-MDI 2.9 software (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry, The Scripps Research Institute).

RESULTS

Proteasome Inhibitors Stabilize Met Fragments

To observe potential labile degradation fragments of Met, MDCK epithelial cells were treated with various proteasome or lysosome inhibitors, including lactacystin, ALLN, MG132, and concanamycin A, and Western blot analyses were performed with an anti-Met antibody directed against the intracellular kinase domain (Figure 1A). After lactacystin treatment, we detected a 50-kDa fragment in addition to the full-length receptor. Similarly, ALLN treatment allowed detection of this 50-kDa fragment, and at higher concentration an additional 55-kDa fragment was observed as a doublet. After MG132 treatment, we detected the 50- and 55-kDa fragments, the 55-kDa band gaining in intensity at the expense of the 50-kDa at high doses. No Met fragments were detected after treatment with the lysosome inhibitor concanamycin A (data not shown). Results consistent with these findings were obtained with HeLa epithelial cells, where the 50- and 55-kDa fragments of Met were detected with antibody directed against the kinase domain. No fragments were detected with antibody directed against the extracellular domain of Met (Figure 1B), which shows that the

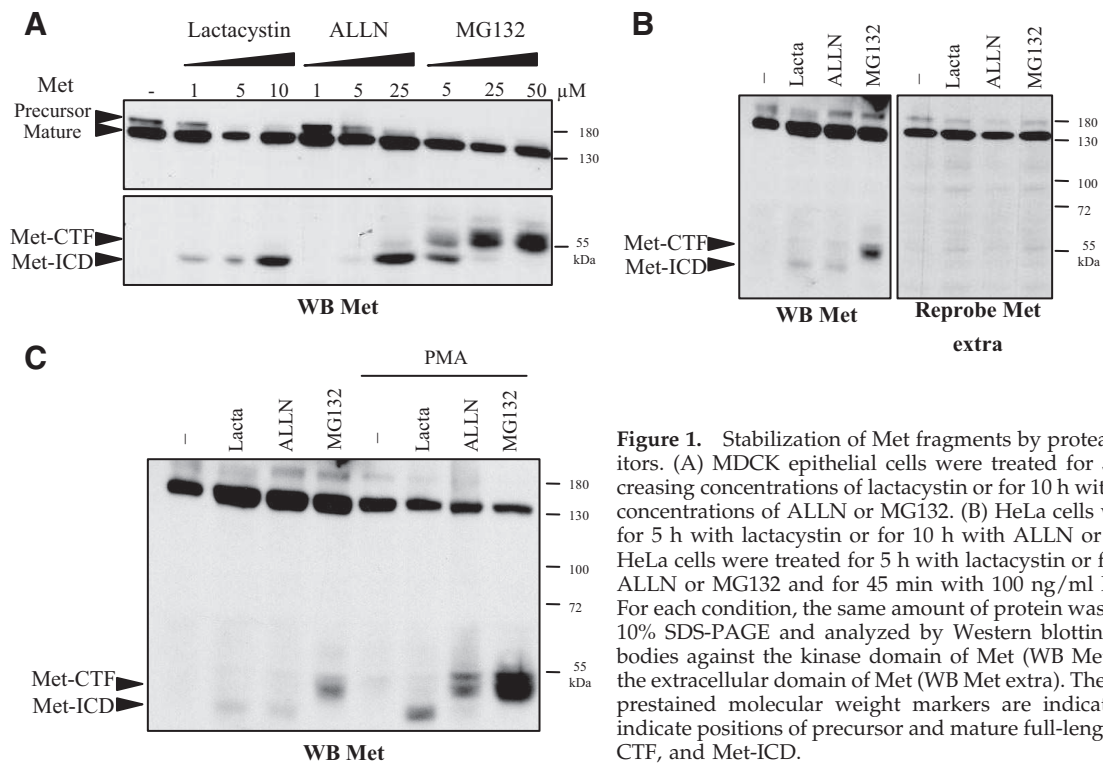


Figure 1. Stabilization of Met fragments by proteasome inhibitors. (A) MDCK epithelial cells were treated for 5 h with increasing concentrations of lactacystin or for 10 h with increasing concentrations of ALLN or MG132. (B) HeLa cells were treated for 5 h with lactacystin or for 10 h with ALLN or MG132. (C) HeLa cells were treated for 5 h with lactacystin or for 10 h with ALLN or MG132 and for 45 min with 100 ng/ml PMA. (A–C) For each condition, the same amount of protein was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with antibodies against the kinase domain of Met (WB Met) or against the extracellular domain of Met (WB Met extra). The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrows indicate positions of precursor and mature full-length Met, Met-CTF, and Met-ICD.

observed fragments are intracellular C-terminal fragments. When MDCK cells were cotreated with PMA plus the proteasome inhibitor lactacystin, ALLN, or MG132, the levels of both 50- and 55-kDa fragments increased, demonstrating that their generation can be stimulated by PMA, a common inducer of membrane receptor cleavages (Figure 1C). Thus, proteasome inhibitors stabilize fragments of Met detected at ~55- and 50-kDa, which we named Met-CTF (C-terminal fragment) and Met-ICD (intracellular domain), respectively.

γ -Secretase Converts Met-CTF to Met-ICD

On the basis of the sizes of these fragments, we estimated that the relevant cleavages of full-length Met were likely to occur near the extracellular juxtamembrane domain for generation of Met-CTF and near the transmembrane domain for Met-ICD. These putative cleavage sites are consistent with shedding and γ -secretase cleavages observed for other type I membrane receptors. Extracellular shedding within the extracellular juxtamembrane region of several type I transmembrane proteins has been shown to be the initial step of a more complex proteolytic process named PS-RIP (Landman and Kim, 2004). In most cases, shedding involves metalloproteases of the ADAM (a disintegrin and metalloprotease) family, generating an N-terminal fragment (NTF) released into the extracellular space and a membrane-anchored C-terminal fragment (CTF). This CTF is further cleaved by the γ -secretase complex (of which presenilin is the catalytic subunit), releasing a fragment containing the ICD (De Strooper, 2003).

To address these hypotheses, we treated MDCK and HeLa epithelial cells with increasing concentrations of E com-

pound, a γ -secretase inhibitor (Figure 2A). We found inhibition of γ -secretase to stabilize the Met-CTF fragment (55 kDa) in a dose-dependent manner. These results suggest that Met-CTF is an intermediate fragment that is further cleaved by γ -secretase. Cellular γ -secretase activity requires expression of PS1 and/or PS2 (Herreman *et al.*, 2000). To assess processing of Met-CTF by γ -secretase, we compared MEFs from wild-type (WT) and PS1-, PS2-, and PS1,2-knockout mice. In the absence of any treatment, cells from both wild-type and single-knockout animals failed to yield any detectable Met-CTF fragment. As expected, treatment by E compound in combination with proteasome inhibitors allowed stabilization of this fragment (Figure 2B). It is worth noticing that lactacystin did not stabilize Met-ICD in MEF, suggesting alternate mechanism of degradation of this fragment in these cells. In contrast, cells from PS1,2-knockout mice showed a detectable level of Met-CTF even in the absence of any treatment. Lactacystin stabilized further this Met-CTF but E compound had no effect. These results demonstrate that both PS1 and PS2 of the γ -secretase complex are involved in cleavage of Met-CTF. In addition, the generated Met-CTF is also labile through a proteosomal degradation.

We next examined the effect of cotreating MDCK cells with a proteasome inhibitor (lactacystin, ALLN, or MG132) and E compound. Met-ICD (50 kDa) was visualized in cells treated with increasing doses of proteasome inhibitor (Figure 2C). Interestingly, cotreatment with E compound abolished the release of Met-ICD, causing concomitant accumulation of Met-CTF. This suggests that Met-CTF is converted to Met-ICD upon γ -secretase cleavage. The MG132 at high concentration induced an effect similar to that caused by cotreatment of MDCK

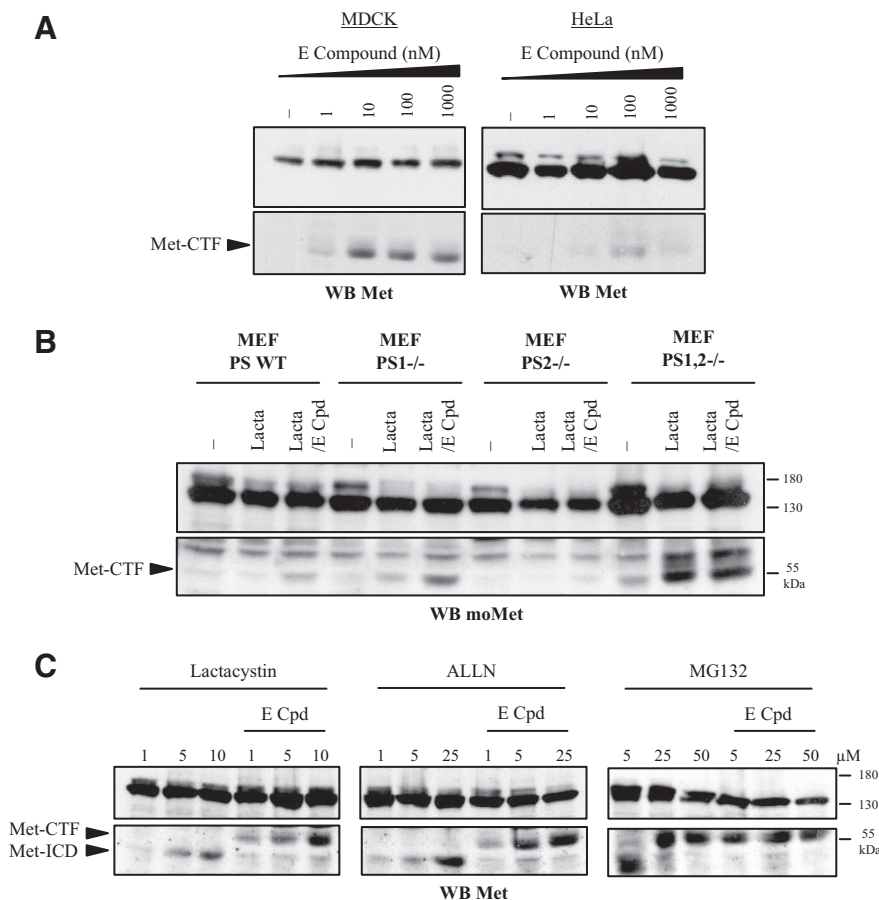


Figure 2. γ -Secretase inhibition prevents the Met-CTF-to-Met-ICD transition. (A) MDCK and HeLa cells were treated or not overnight with increasing concentrations of E compound. (B) Wild-type mouse embryonic fibroblasts (MEF PS WT), presenilin 1-deficient MEF (PS1^{-/-}), presenilin 2-deficient MEF (PS2^{-/-}), and presenilin 1- and 2-deficient MEF (PS1,2^{-/-}) were treated or not overnight with 1 μ M E compound (E-Cpd). The following day, the cells were treated or not for 5 h with 10 μ M lactacystin. (C) MDCK epithelial cells were treated or not overnight with 1 μ M E compound. The following day the cells were treated for 5 h with increasing concentrations of lactacystin or for 10 h with increasing concentrations of ALLN or MG132. (A–C) For each condition, the same amount of protein was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with an antibody directed against the kinase domain of Met (WB Met) or the C-terminal domain of mouse Met for the Western blot produced with MEF extracts (WB moMet). Arrows indicate positions of Met-CTF and Met-ICD.

cells with lactacystin and E compound. This may be attributable to inhibition of γ -secretase activity by MG132, as previously reported (Zhang *et al.*, 1999). Similar results were obtained when MDCK cells were cotreated with the proteasome inhibitor lactacystin and two other γ -secretase inhibitors L-685 458 and DAPT (Supplementary Data, Supplementary Figure S1). Taken together, these results suggest that Met-CTF is cleaved by γ -secretase to generate Met-ICD, both Met fragments being sensitive to proteasome degradation.

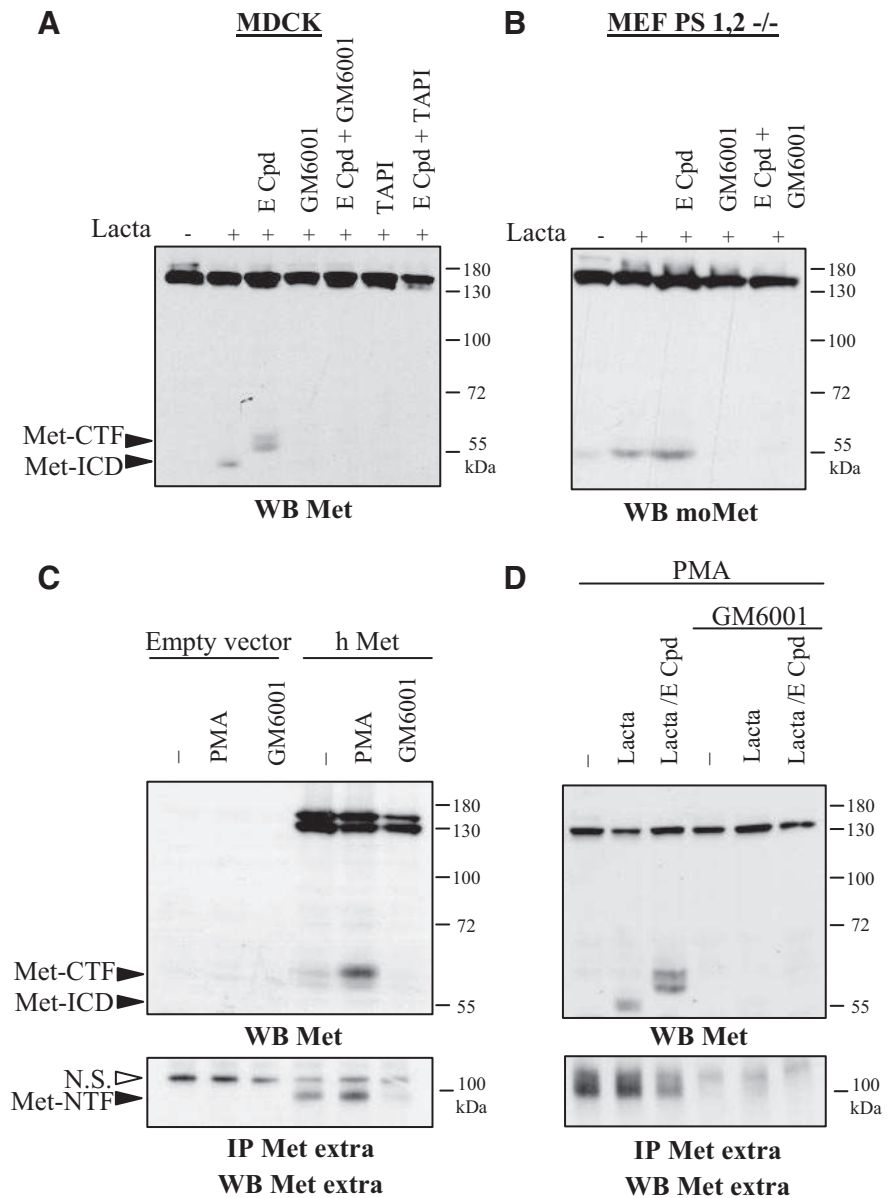
Metalloprotease-mediated Shedding of Met Is a Prerequisite for γ -Secretase Cleavage

In most cases, presenilin cleavages are preceded by ectodomain shedding, notably involving proteases of the ADAM family. We checked the effect of metalloprotease inhibitors on generation of Met fragments. Inhibition of zinc metalloprotease activity by the broad-spectrum inhibitor GM6001 (Galardy *et al.*, 1994) or the ADAM inhibitor TAPI-1 (Slack *et al.*, 2001) prevented stabilization of both Met-ICD and Met-

CTF induced in MDCK cells by E compound and lactacystin (Figure 3A). Similar inhibition of Met-CTF generation by TAPI-1 was observed in human mammary epithelial cells MCF10A (Supplementary Figure S2). Inhibition of metalloprotease activity likewise prevented Met-CTF generation in PS1,2-deficient MEF, which normally accumulate this fragment, particularly upon lactacystin treatment (Figure 3B).

Ectodomain shedding could generate, in addition to Met-CTF, a soluble 90-kDa Met-NTF. To test for the generation of extracellular fragments, we transiently transfected MDCK cells with a construct encoding human Met and then used an antibody against the extracellular part of human Met to immunoprecipitate Met-NTF from the culture supernatant, before detection by Western blotting. Detection of Met-NTF was found to increase with PMA treatment and to disappear with GM6001 treatment (Figure 3C). Similarly, in the culture medium of HeLa cells treated with PMA to promote PS-RIP, we detected soluble Met-NTF. In addition, Met-CTF and Met-ICD were detected in the cell lysate upon treatment

Figure 3. Metalloprotease inhibitors prevent generation of both Met-CTF and Met-ICD. (A) MDCK cells were left untreated (–) or were treated overnight with 1 μ M E compound and/or 25 μ M GM6001 and 50 μ M TAPI-1. The following day the cells were treated for 5 h with 10 μ M lactacystin. (B) MEF PS1,2 –/– were left untreated or treated overnight with 1 μ M E compound and/or 25 μ M GM6001. The following day the cells were treated for 5 h with 10 μ M lactacystin. (C) MDCK cells transiently transfected with either the empty vector or a vector expressing human Met (h Met) were treated or not overnight with 25 μ M GM6001. The following day, the cells were treated for 45 min with 100 ng/ml PMA. The culture medium was collected and immunoprecipitation was performed with an antibody directed against the extracellular domain of human Met. (D) HeLa cells were treated or not overnight with 1 μ M E compound and/or 25 μ M GM6001. The following day, the cells were treated for 5 h with 10 μ M lactacystin and for 45 min with 100 ng/ml PMA. The culture medium was collected, and immunoprecipitation was performed with an antibody directed against the extracellular domain of human Met. (A–D) For each condition, the same amount of protein was resolved by 10% SDS-PAGE or 7% SDS-PAGE for IP and analyzed by Western blotting with different anti-Met antibodies as indicated. Arrows indicate positions of Met-CTF, Met-ICD, and Met-NTF.



with γ -secretase and proteasome inhibitor, respectively (Figure 3D). Inhibition of metalloprotease activity by GM6001 prevented generation of both intracellular fragments Met-ICD and -CTF and of the extracellular fragment Met-NTF. This suggests the involvement of metalloprotease in an initial step of shedding, necessary for subsequent γ -secretase cleavage.

In most known cases of metalloprotease-dependent shedding followed by γ -secretase proteolysis, ADAM-17 and ADAM-10 are involved (Huovila *et al.*, 2005). To check the involvement of these proteases in Met shedding, we used siRNA to knock down their expression in human epithelial cells MCF10A. Silencing of ADAM-17 partially inhibited generation of Met-CTF, indicating that ADAM-17 participates to Met processing (Figure 4). In contrast, silencing of ADAM-10 did not inhibit Met cleavages (data not shown).

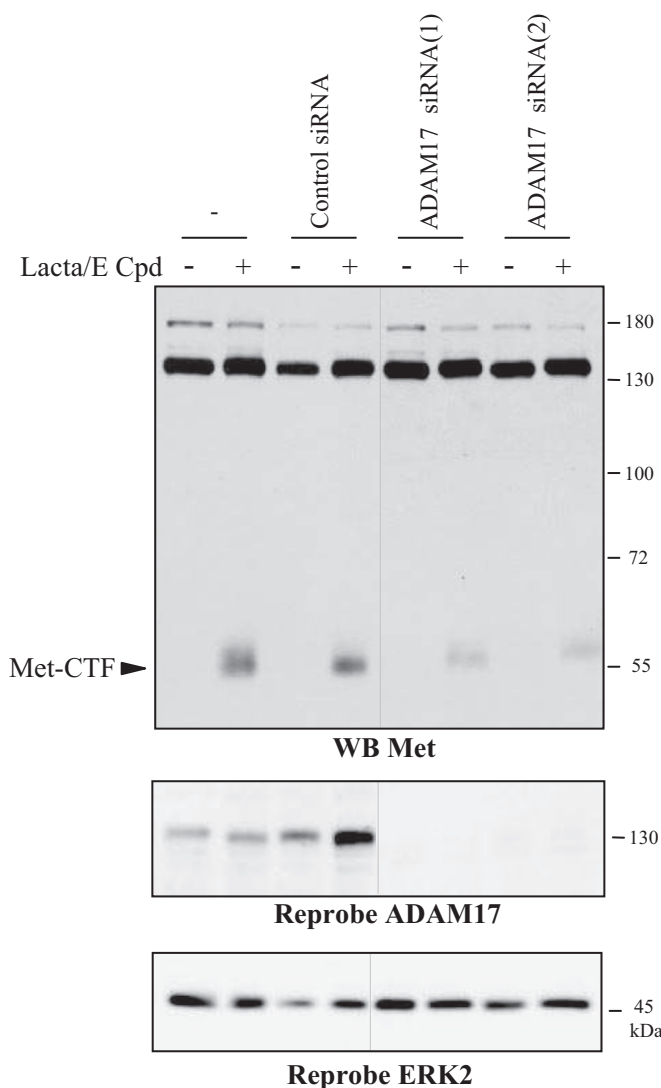


Figure 4. ADAM-17 is involved in Met shedding. MCF10A cells were transfected or not with siRNA control or targeting the ADAM-17. Cells were then treated or not overnight with 1 μ M E compound and the following day 5 h with 10 μ M lactacystin. Proteins were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with antibodies directed against the kinase domain of Met (WB Met). The filter was stripped and reprobed with an antibody directed against the ADAM-17 and against ERK2 to assess the loading. The two parts of the panels were on the same gel. Arrows indicate the position of Met-CTF.

Taken together, our results demonstrate that metalloprotease-mediated shedding from Met generates both a N-terminal fragment Met-NTF and a C-terminal fragment Met-CTF, which is in turn cleaved by γ -secretase to generate the unstable Met-ICD. Furthermore, Met-NTF is released into the extracellular medium, suggesting that the ectodomain shedding of Met targets membrane-anchored receptor.

Sequential Proteolysis of Met Is Independent of Kinase Activation

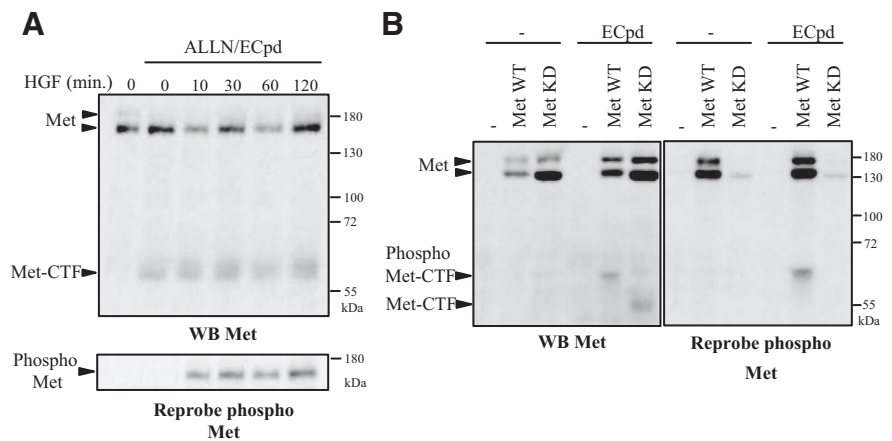
PS-RIP of several type I membrane receptors such as Notch and ErbB4 is regulated by ligand stimulation (Brou *et al.*, 2000; Mumm *et al.*, 2000; Ni *et al.*, 2001). Therefore, we cotreated MDCK cells with a proteasome and γ -secretase inhibitors to stabilize Met-CTF and stimulated the cells with HGF/SF (Figure 5A). HGF/SF stimulation induced tyrosine phosphorylation of Met. However, as we did not observe any modulation of Met-CTF generation in response to HGF/SF over the test period, it appears that ligand activation of Met is not involved in this process. Furthermore, in MDCK cells transiently transfected with a construct encoding either wild-type or kinase-dead full-length Met (Met WT and Met kinase dead, respectively), γ -secretase inhibition was found to allow stabilization of Met-CTF generated from either full-length proteins (Figure 5B). As expected, antibody against phosphorylated tyrosine residues of Met detected efficiently the Met WT, whose overexpression induced constitutive phosphorylation, in contrast to the Met kinase-dead variant. It is noteworthy that the Met-CTF generated from Met WT migrated more slowly than that generated from Met kinase dead, probably as a result of Met WT phosphorylation. PS-RIP of Met, which seems independent from ligand stimulation and kinase activity, thus contrasts with the main down-regulation mechanism described for Met, e.g., ubiquitin-dependent degradation, which requires HGF/SF stimulation and a proper kinase activity (Peschard *et al.*, 2004).

Membrane Accumulation of an Uncleavable TRK-Met Chimera

Chimeric receptors, possessing the intracellular region of a studied receptor fused to the extracellular region of another receptor not expressed by the recipient cells, are widespread tools for elucidating the intracellular signaling of RTKs. The advantage is that it is possible to stimulate the chimera without activating the endogenous receptor. Chimeric TRK-Met receptors mediate Met-specific signals in epithelial cells in response to NGF (Tulasne *et al.*, 1999). To investigate further the prerequisites to extracellular cleavage of Met by metalloproteases, we produced constructs encoding the extracellular TRKA domain fused either directly to the transmembrane domain of the Met receptor, so as to replace the entire the extracellular domain (TRK-Met), or to the 50-amino acid extracellular juxtamembrane domain of Met (TRK-Met-juxta; Figure 6A). MDCK epithelial cells were stably transfected with TRK-Met and TRK-Met-juxta, and two clones expressing each construct were analyzed (TRK-Met clones 5 and 21; TRK-Met-juxta clones 7 and 47).

In cells expressing TRK-Met-juxta, Met-ICD was weakly detected in lactacystin-treated cells, and cotreatment with lactacystin and E compound generates important amount of Met-CTF, suggesting that γ -secretase cleavage of TRK-Met-juxta is very efficient. In contrast, no fragment was detected in cells expressing TRK-Met (Figure 6B and Supplementary Figure S3). This suggests that the extracellular region of TRK does not allow proper metalloprotease cleavage leading to further γ -secretase cleavage, whereas addition of the jux-

Figure 5. HGF/SF does not influence PS-RIP of Met. (A) MDCK cells were treated or not overnight with 1 μ M E compound and the following day 10 h with ALLN. Cells were then stimulated with HGF/SF (30 ng/ml) at the indicated time. (B) MDCK cells transiently transfected with either the empty vector or the vector expressing full-length human wild-type Met (Met WT) or kinase-dead Met (Met KD) were treated or not overnight with 1 μ M E compound. (A and B) Proteins were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with antibodies directed against the kinase domain of Met (WB Met). The filter was stripped and reprobed with an antibody directed against the phosphorylated tyrosine residues of the kinase domain of Met. Arrows indicate the positions of Met, Met-CTF and phosphorylated Met and Met-CTF.



tamembrane domain of Met rescues the entire proteolytic process.

Another interesting observation was made on the TRK-Met and TRK-Met-juxta profiles (Figure 6B). TRK-Met chimeras are detected as a 180-kDa glycosylated mature form and a 140-kDa nonglycosylated immature form (Tulasne *et al.*, 1999). The mature form was more abundant than the immature form in TRK-Met-expressing cells but much less abundant in TRK-Met-juxta-expressing cells. To assess the effect of PS-RIP on the expression profile, we treated cells stably expressing one or the other chimera with a metalloprotease inhibitor (Figure 6C). On treatment, we observed an increase of the mature form in cells expressing TRK-Met-juxta, whereas expression of the immature form was not significantly modified. In cells expressing TRK-Met, metalloprotease inhibition did not modify the expression profile. Next we checked whether metalloprotease inhibition might affect the receptor half-life. Protein synthesis was inhibited with CHX in cells expressing TRK-Met and TRK-Met-juxta, and receptor expression was measured over time (Figures 6, D and E). Under these conditions, the half-life of TRK-Met was ~6 h and that of TRK-Met-juxta was <2 h. The matrix metalloprotease inhibitor GM6001 partially restored the stability of the TRK-Met-juxta chimera (Figure 6D). These results demonstrate that PS-RIP is able to down-regulate the expression of the mature receptor.

To evaluate subcellular localization of TRK-Met and TRK-Met-juxta, immunofluorescence staining with an antibody recognizing the intracellular domain of mouse Met was performed on MDCK cells expressing one or the other chimera (Figure 7A). When untreated, cells expressing TRK-Met displayed both membrane-localized and perinuclear staining, whereas cells expressing TRK-Met-juxta displayed only perinuclear staining. Perinuclear staining likely corresponds to intracellular maturation steps. Flow cytometry analysis applied to nonpermeabilized cells exposed to an antibody recognizing the extracellular domain of TRKA confirmed the membrane localization of TRK-Met but not TRK-Met-juxta (Figure 7B). Treatment with a metalloprotease inhibitor partially restored expression of TRK-Met-juxta at the plasma membrane, without affecting the localization of TRK-Met (Figure 7A). These observations are consistent with the rescue of the expression of the mature TRK-Met-juxta upon metalloprotease inhibitor treatment. This demonstrates that different expressions between cleavable and uncleavable chimeras are the consequence of their different post transcriptional processing by PS-RIP.

Finally, we evaluated the phosphorylation state of the cleavable and uncleavable TRK-Met versions by immunoprecipitating the chimeras (to avoid detecting the endogenous Met receptor) and evaluating their phosphorylation with antibodies directed against phosphorylated Met tyrosine residues (Figure 7C). The mature TRK-Met was detected as a phosphorylated receptor, despite the absence of ligand stimulation. In contrast, no phosphorylation of mature TRK-Met-juxta receptor was detected. As expected, treatment of cells with a specific ATP competitor of the Met kinase abolished TRK-Met phosphorylation. Taken together, these results demonstrate that impairment of PS-RIP induces membrane accumulation of activated receptors in Met-transfected cells.

Uncleavable TRK-Met Receptor Displays Ligand-independent Invasive Growth

To evaluate the impact of the defect of PS-RIP on the biological responses triggered by Met in epithelial cells, we compared the phenotypes of MDCK cells expressing TRK-Met and TRK-Met-juxta, cultured under different conditions and ligand-stimulated or not. The cells were seeded on plastic at low density. Under such conditions, they form small islets in the absence of stimulation and scatter in response to ligand stimulation (Figure 8A). The cells were also cultured on Matrigel, a basement membrane preparation. On this, ligand stimulation promotes the generation of extensions from small aggregates, resulting in formation of a spider web-like network (Figure 8C).

In response to NGF, MDCK cells expressing TRK-Met and TRK-Met-juxta scattered similarly and formed comparable networks on Matrigel, demonstrating that PS-RIP processing does not affect ligand-dependent responses (Figures 8, A and C). As expected, untransfected MDCK cells did not respond to NGF. In the absence of NGF stimulation, cells expressing TRK-Met and TRK-Met-juxta displayed different phenotypes. TRK-Met-juxta cells were phenotypically indistinguishable from untransfected MDCK cells, both forming condensed islets on plastic or round cysts on Matrigel. TRK-Met cells, in contrast, displayed basal scattering. When the islets were stained with phalloidin to reveal actin fibers, those formed by TRK-Met-juxta-expressing cells showed intense staining at their borders, whereas islets of TRK-Met-expressing cells displayed more weakly stained borders, with disrupting pseudopods (Figure 8B). On Matrigel, accordingly, TRK-Met-expressing cells displayed a basal connective structure between cysts (Figure 8C). Treatment with

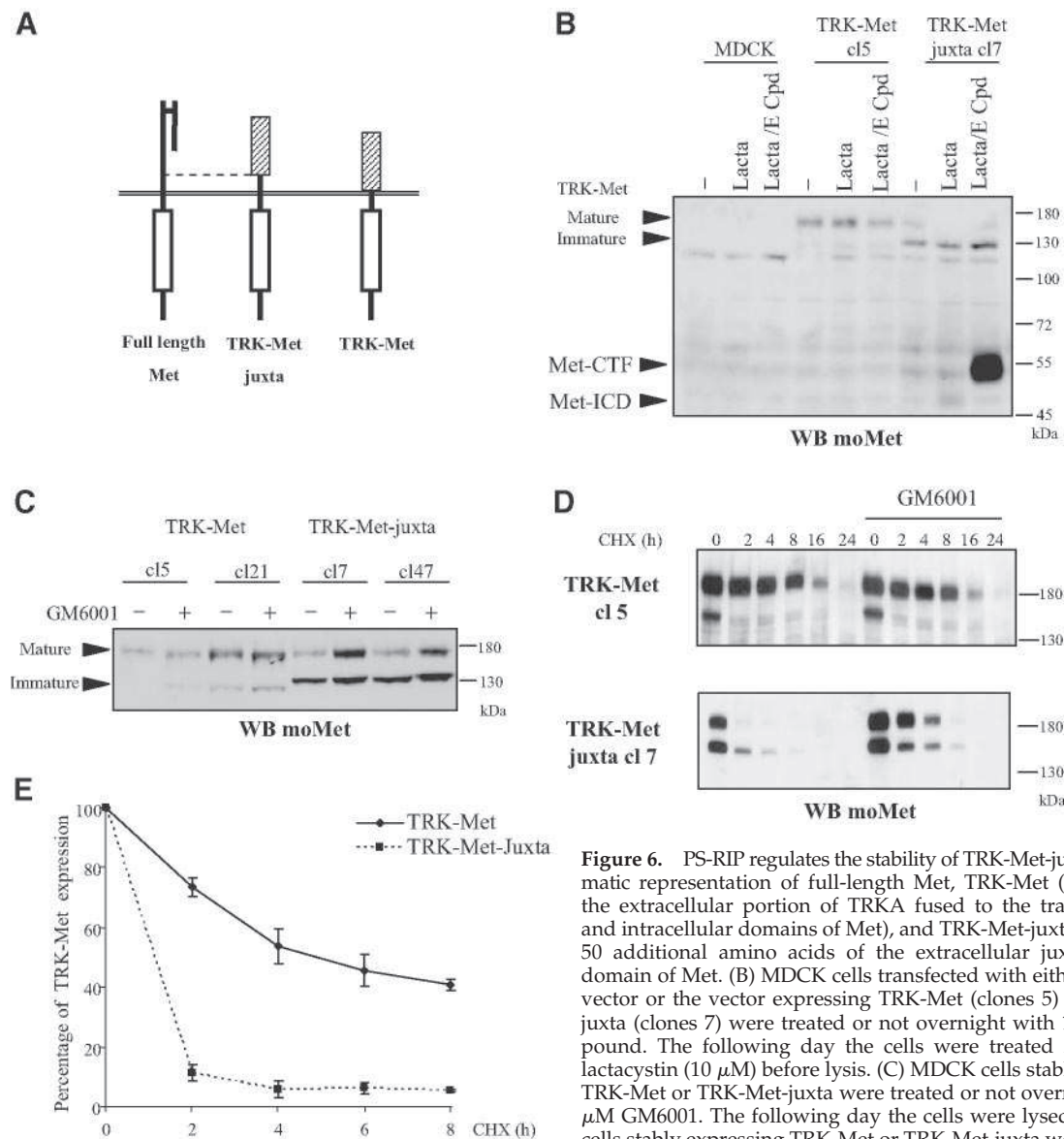


Figure 6. PS-RIP regulates the stability of TRK-Met-juxta. (A) Schematic representation of full-length Met, TRK-Met (consisting of the extracellular portion of TRKA fused to the transmembrane and intracellular domains of Met), and TRK-Met-juxta, possessing 50 additional amino acids of the extracellular juxtamembrane domain of Met. (B) MDCK cells transfected with either the empty vector or the vector expressing TRK-Met (clones 5) or TRK-Met-juxta (clones 7) were treated or not overnight with 1 μ M E compound. The following day the cells were treated for 5 h with lactacystin (10 μ M) before lysis. (C) MDCK cells stably expressing TRK-Met or TRK-Met-juxta were treated or not overnight with 25 μ M GM6001. The following day the cells were lysed. (D) MDCK cells stably expressing TRK-Met or TRK-Met-juxta were treated or not overnight with 25 μ M GM6001. The following day the cells were treated with 25 μ g/ml CHX for the indicated time. (B–D) Proteins were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with antibodies directed against the C-terminal domain of mouse Met (WB moMet). Arrows indicate the positions of the mature and immature forms of TRK-Met and TRK-Met-juxta, Met-CTF, and Met-ICD. (E) MDCK cells expressing TRK-Met or TRK-Met-juxta were treated or not with 25 μ g/ml CHX for the indicated time. Luminescence from the Western blot was captured with a CCD camera and the expression levels of mature TRK-Met were quantified. The percentage of expression was calculated using the untreated control as the reference ($n = 3$, $\pm$ SD).

a specific ATP competitor of the Met kinase (SU11274) abolished the distinctive scattering and morphogenetic patterns of TRK-Met cells, demonstrating that these phenotypes depend on Met activity. As expected, this Met inhibitor also inhibited scattering and morphogenesis induced in response to HGF/SF and NGF (Supplementary Figures S4A and S5, A and B). We obtained similar results with the two independent clones of each type (expressing either TRK-Met or TRK-Met-juxta; Supplementary Figures S4B and S5B). We next tested TRK-Met- and TRK-Met-juxta-expressing MDCK cells in an *in vitro* migration assay (Figure 8D). In this assay, TRK-Met-expressing cells proved to be about 10 times more invasive than the TRK-Met-juxta-expressing cells, but their migration was markedly reduced in the presence of a Met inhibitor. Similar strong basal migration was observed with

two additional clones of TRK-Met-expressing MDCK cells (Supplementary Figure S6). Taken together, these results show that failure of the Met receptor tyrosine kinase to undergo PS-RIP results in its accumulation, leading to ligand-independent activation of epithelial invasive growth.

Met Inhibitory Antibody Promotes PS-RIP of the Receptor

It has been recently shown that the mAb DN30, directed against extracellular region of human Met, is able to induce Met degradation (Petrelli *et al.*, 2006). In consequence, this inhibitory antibody hampers ligand-independent biological activity triggered by the overexpressed Met, including transformed phenotypes of cancer cells and reduction of tumor growth.

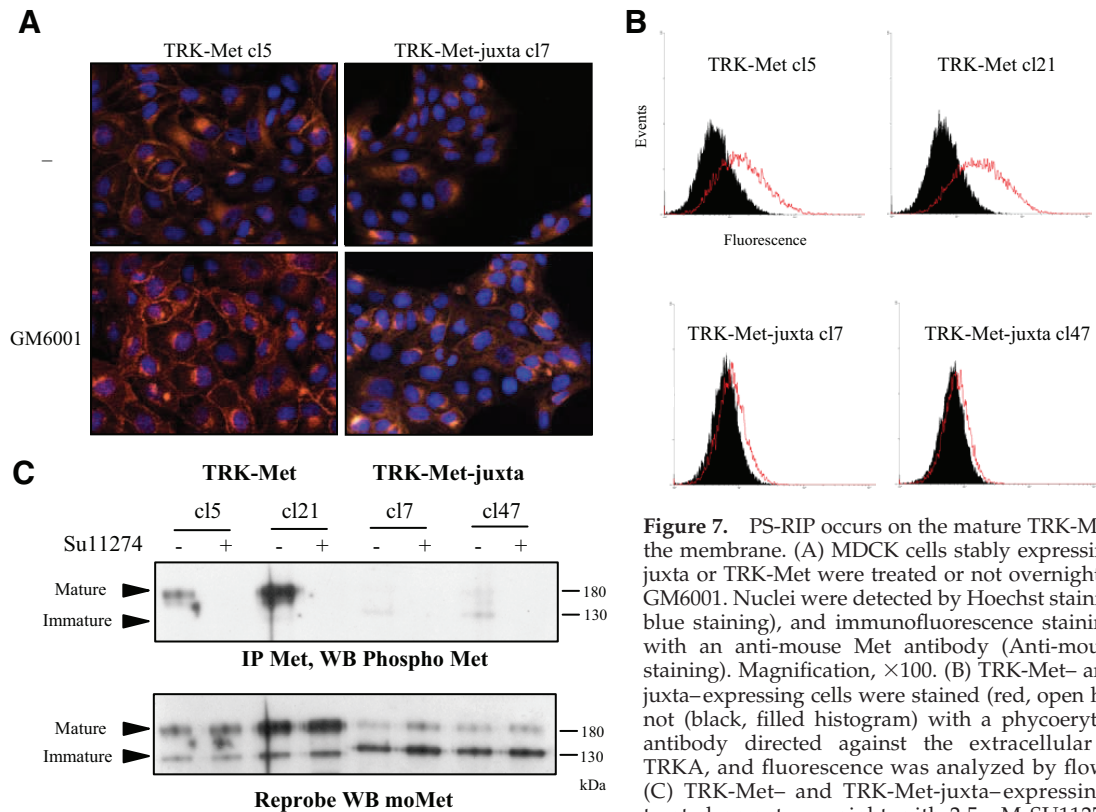


Figure 7. PS-RIP occurs on the mature TRK-Met chimera at the membrane. (A) MDCK cells stably expressing TRK-Met-juxta or TRK-Met were treated or not overnight with 25 μ M GM6001. Nuclei were detected by Hoechst staining (Hoechst, blue staining), and immunofluorescence staining was done with an anti-mouse Met antibody (Anti-mouse Met, red staining). Magnification, $\times 100$. (B) TRK-Met- and TRK-Met-juxta-expressing cells were stained (red, open histogram) or not (black, filled histogram) with a phycoerythrin-coupled antibody directed against the extracellular domain of TRKA, and fluorescence was analyzed by flow cytometry. (C) TRK-Met- and TRK-Met-juxta-expressing cells were treated or not overnight with 2.5 μ M SU11274. Immuno-

precipitation was performed with an anti-mouse Met antibody. Proteins were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with an antibody against phosphorylated tyrosine residues of the kinase domain of Met. The filter was stripped and reprobed with an antibody directed against mouse Met. Arrows indicate the positions of the mature and immature forms of TRK-Met and TRK-Met-juxta.

Because this forced degradation involved proteolytic cleavages by molecular mechanisms which were not identified, we hypothesized the involvement of the PS-RIP. Treatment with DN30 induced decrease of membrane-anchored Met from the mammary metastatic cancer cells line MDA-MB231 overexpressing Met, detected by flow cytometry (Figure 9A). Consistently to down-regulation of Met, DN30 treatment reduced migration of the MDA-MB231 cells subjected to an in vitro invasion assay (data not shown). Next, we showed that Met-CTF generation induced by γ -secretase inhibitor is increased in presence of DN30 antibody, concomitantly to down-regulation of the mature Met, suggesting that the inhibitory antibody favors PS-RIP of the receptor (Figure 9B). Similar results were obtained in other transformed cell lines, including the gastric and the prostatic carcinoma cell lines GTL16 (Supplementary Figure S7) and PC-3 (data not shown). Finally treatment with the metalloprotease inhibitor TAPI-1, which interferes with the initial step of the PS-RIP, inhibited generation of Met-CTF and partially rescued the degradation of the mature full-length Met (Figure 9C). This demonstrates that the DN30 inhibitory antibody promotes Met PS-RIP leading to receptor degradation.

DISCUSSION

We report here that the Met receptor tyrosine kinase is processed by PS-RIP. Mechanistically, PS-RIP of Met involves two cleavage steps. The first step is metalloprotease-mediated shedding of the extracellular domain, generating a

soluble N-terminal fragment (Met-NTF) and a membrane-anchored fragment (Met-CTF). This step is a prerequisite to an additional cleavage by γ -secretase, yielding a labile Met-ICD fragment. Met ectodomain shedding has been described previously on the basis of initial observations of a soluble extracellular form of Met (Prat *et al.*, 1991; Crepaldi *et al.*, 1994). This process has been observed in various cell types and has been induced with different agents such as PMA, suramine, epidermal growth factor (EGF), lysophosphatidic acid (LPA), and HGF/SF (Prat *et al.*, 1991; Galvani *et al.*, 1995; Nath *et al.*, 2001; Wajih *et al.*, 2002). In addition, other fragments have been observed, such as phosphorylated membrane-anchored fragments degraded via the proteosomal pathway or labile nuclear fragments (Jeffers *et al.*, 1997; Pozner-Moulis *et al.*, 2006). Our work suggests that these previously observed fragments of Met, initially described independently, could be produced through a common proteolytic process, PS-RIP.

The metalloprotease most commonly implicated in shedding of transmembrane protein is the ADAM-17. ADAM-17 notably contributes to the regulation of signaling pathways by mediating ectodomain shedding from cytokine receptors, including the tyrosine kinase receptors ErbB4 and TRKA (Huovila *et al.*, 2005). We demonstrated that ADAM-17 participates also to the initial step of the Met PS-RIP. However, although silencing of ADAM-17 was efficient in the MCF10A epithelial cells, the inhibition of the Met cleavages was partial, suggesting that other metalloproteases could process Met. Interestingly, it has been recently shown in NIH3T3 cells that shedding of Met involves the ADAM-10 (Kopitz *et*

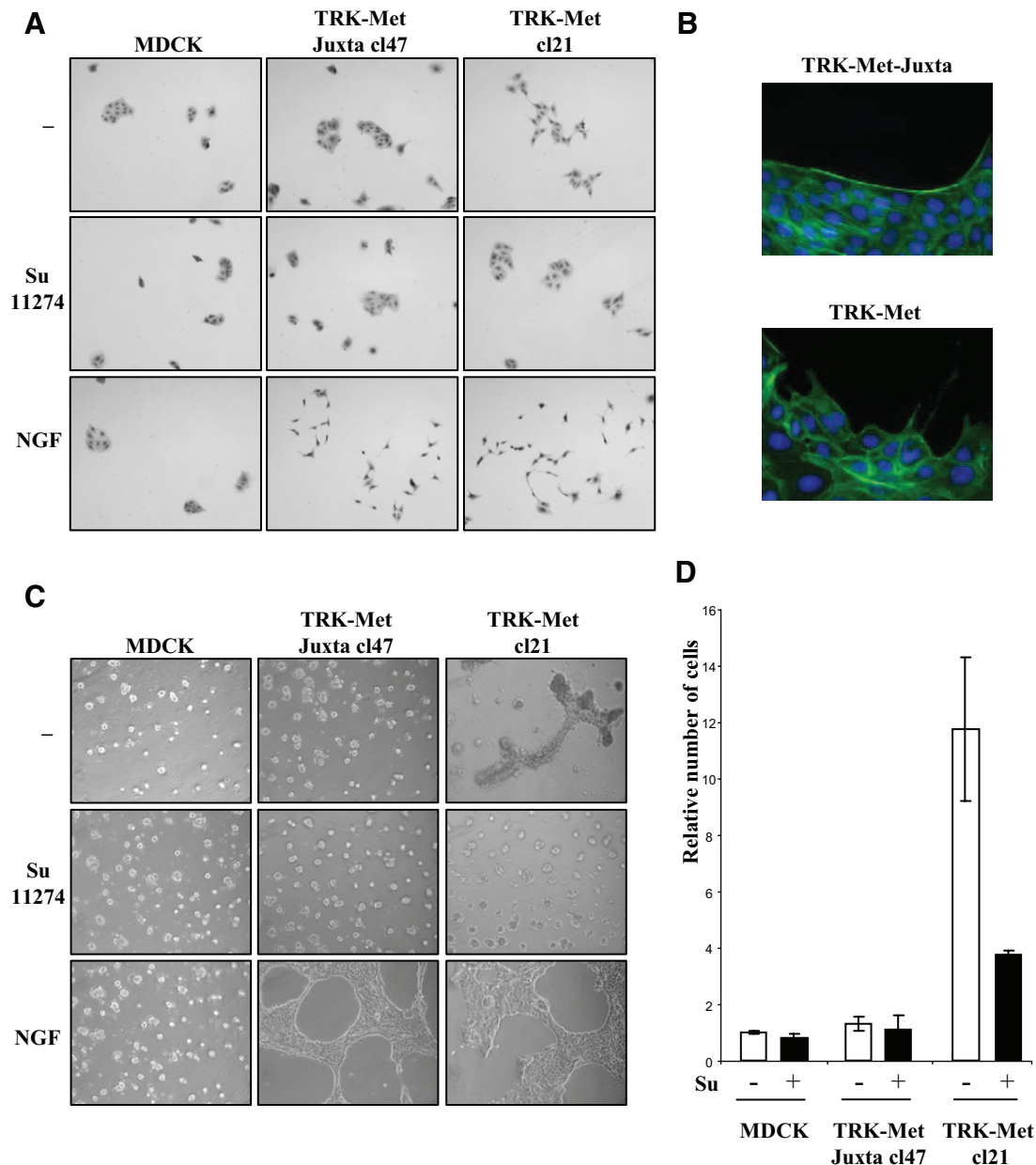


Figure 8. PS-RIP of TRK-Met chimera prevents its basal activation and the induction of invasive growth. (A) Scattering from cell islets. MDCK stably expressing TRK-Met and TRK-Met-juxta were seeded at low density. The next day the cells were cultured in the presence or absence of 2.5 μ M SU11274 and/or 100 ng/ml NGF. Magnification, $\times 40$. (B) MDCK stably expressing TRK-Met and TRK-Met-juxta were seeded at low density. The next day, the cells were fixed and stained for F-actin with phalloidin. Magnification, $\times 100$. (C) Morphogenesis on Matrigel gels. MDCK stably expressing TRK-Met and TRK-Met-juxta were cultured on Matrigel gels. The following day, cells were incubated with or without SU11274 and/or NGF. Magnification, $\times 60$. (D) MDCK stably expressing TRK-Met and TRK-Met-juxta, cultured in invasion chambers, were treated or not with 5 μ M SU11274, a Met kinase inhibitor. The relative number of infiltrated cells was determined after staining of nuclei with Hoechst ($n = 3$, $\pm$ SD).

et al., 2007). Therefore, the shedding of Met could implicate several metalloproteases, which could be differently engaged according to the cell type.

Met ectodomain shedding is immediately followed by γ -secretase cleavage, because Met-CTF is observed only upon γ -secretase inhibition. Furthermore, a 50-amino acid stretch of the Met extracellular juxtamembrane domain, added to the TRK-Met chimera, is necessary and sufficient to initiate ectodomain shedding and further γ -secretase cleavage. This is consistent with the observation that γ -secretase cleavage depends on prior ectodomain shedding (Struhl and

Adachi, 2000). Presenilin is the catalytic core of the γ -secretase complex (De Strooper, 2003). Accordingly, we show here that both PS1 and PS2 are involved in Met cleavage. This is consistent with results obtained with APP and Notch, whose γ -secretase-mediated cleavage is abolished only in embryonic stem cells devoid of both PS1 and PS2 (Herreman *et al.*, 2000).

We then explored the functional consequences of PS-RIP using cleavable and uncleavable version of chimeric TRK-Met receptor. We found that the TRK-Met Juxta is efficiently processed by the PS-RIP; consequently the mature form of

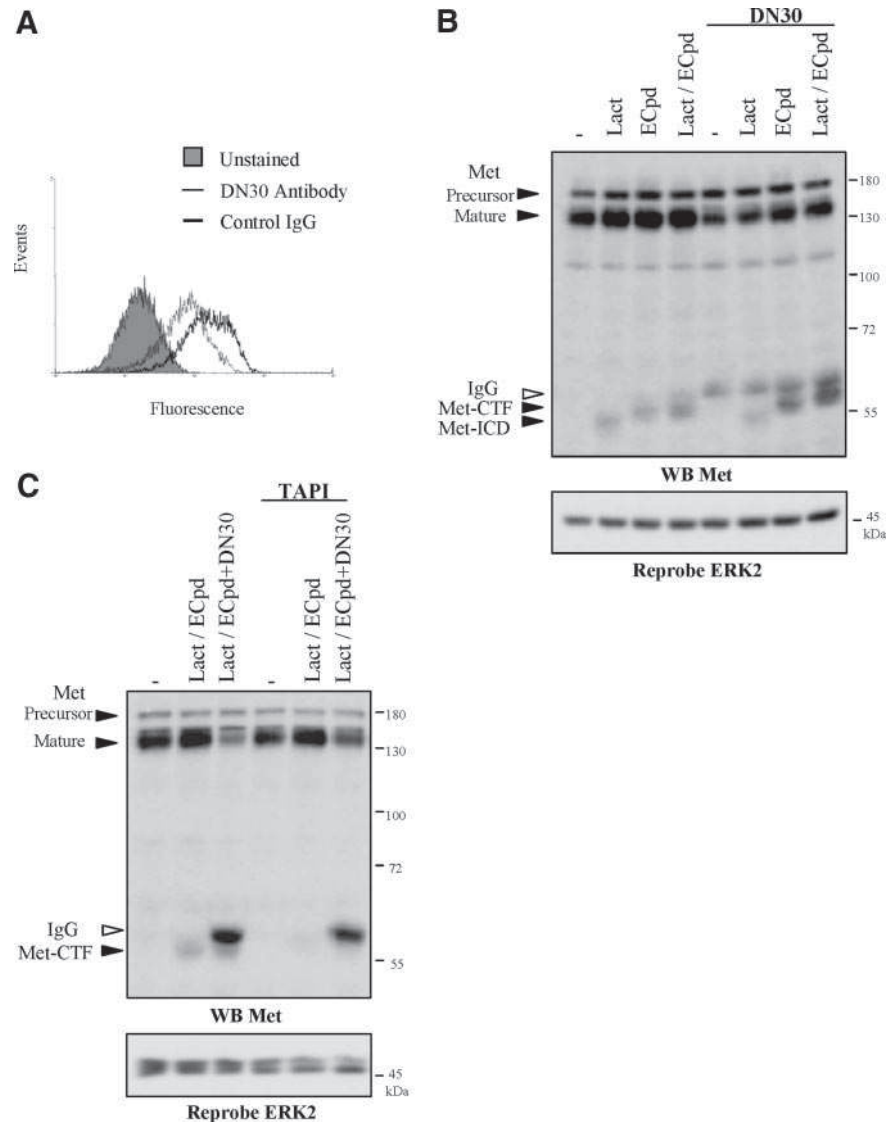


Figure 9. Induction of the Met PS-RIP by the Met inhibitory antibody DN30. (A) MDA-MB231 cells were treated 48 h with 40 μ g/ml DN30 antibody (open histogram, thin line) or nonrelevant IgG (open histogram, thick line). The cells were then incubated or not (filled histogram) with an antibody directed against the extracellular domain of Met and fluorescein-conjugated antibody. The fluorescence was analyzed by flow cytometry. (B) MDA-MB231 cells were treated or not with 40 μ g/ml DN30 antibody. The following day the cells were incubated or not overnight with 1 μ M E compound and then treated for 5 h with 10 μ M lactacystatin. (C) MDA-MB231 cells were treated or not with 40 μ g/ml DN30 antibody. The following day the cells were treated or not overnight with 1 μ M E compound and 50 μ M TAPI-1. The cells were then treated for 5 h with 10 μ M lactacystatin. (B and C) Proteins were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with antibodies directed against the kinase domain of Met (WB Met). The filter was stripped and reprobed with an antibody directed against ERK2. Arrows indicate the positions of precursor and mature full-length Met, Met-CTF, Met ICD, and IgG from DN30 antibody.

the cleavable TRK-Met-juxta chimera has a shorter half-life than that of the uncleavable TRK-Met and does not accumulate at the plasma membrane. Furthermore, we showed that the anti-Met antibody DN30, known to induce down-regulation of the membrane-anchored Met promotes Met PS-RIP. Therefore, inhibition of Met PS-RIP through expression of an uncleavable receptor induces its membrane accumulation, whereas inversely forced Met PS-RIP by antagonist antibody induces its membrane depletion. Taken together, our results demonstrate that PS-RIP of Met leading to generation of intracellular instable fragments is able to regulate membrane expression of the receptor. It is worth noticing that in MDCK cells for instance, inhibition of basal PS-RIP by metalloprotease inhibitor does not significantly increase expression of Met. This suggests that although induced PS-RIP destabilizes Met, the basal PS-RIP could be insufficient to reduce significantly the expression of Met.

Although we demonstrated that Met PS-RIP can be enhanced by specific antibody, the physiological stimuli able to promote the process are unknown. Indeed, stimulation of Met by HGF/SF does not induce its PS-RIP in normal epithelial cells. This contrast with induction of the Met shedding in response to HGF/SF observed in normal human

aortic smooth muscle cells (Wajih *et al.*, 2002), suggesting that Met proteolysis can be constitutive or activated by its ligand according to the cell type. Our data also highlight how PS-RIP of Met differs from Met degradation involving the E3 ubiquitin ligase c-Cbl. In this latter process, ligand stimulation induces recruitment of c-Cbl to phosphorylated tyrosines of the receptor. This promotes ubiquitination of Met, its endocytosis, and ultimately its lysosomal degradation (Hammond *et al.*, 2003), thereby attenuating the signaling induced by the activated receptor. In contrast, PS-RIP of Met in epithelial cells is ligand-independent and does not require the kinase activity of the receptor.

A well-described cause of deregulated invasive growth induced by Met is its overexpression, which causes autocrine or paracrine stimulation by HGF/SF or induces self-activation of the receptor independently of ligand stimulation (Birchmeier *et al.*, 2003). Overexpression has been attributed to gene amplification or to increased transcription induced by oncogenes. Yet aberrant activation of Met can be the consequence of a defective down-regulation mechanism, as it is well documented in the case of enhanced cell transformation resulting from uncoupling of Met from c-Cbl-mediated down-regulation (Peschard *et al.*, 2004). Aberrant

Met activation can also result from defective proteolytic cleavage. In a colon carcinoma cell line, noncleavage of the Met precursor was found to lead to expression of a constitutively active receptor (Mondino *et al.*, 1991). In this same line, we demonstrate here that impairment of TRK-Met chimera cleavage by PS-RIP results in accumulation of the receptor at the plasma membrane, accompanied with ligand-independent scattering, morphogenesis, and invasion of normal epithelial cells. Inversely, the Met inhibitory antibody DN30, inhibiting transformed phenotype of cancer cells (Petrelli *et al.*, 2006), take advantage of the PS-RIP mechanism to induce Met down-regulation in cells dependent of Met for their transformation. Thus, regulation of the Met PS-RIP could play an important role against cellular transformation by preventing overexpression of Met at the plasma membrane.

Although development of inhibitory antibodies directed against membrane oncogenes is a promising therapeutic approach, the molecular mechanisms underlying their activity are not fully understood. Our data demonstrate that the Met inhibitory antibody acts through an original mechanism involving forced induction of an intrinsic mechanism of degradation, leading to depletion of the receptor. Thus, forced induction of Met PS-RIP might be used therapeutically to prevent uncontrolled activation of the receptor.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut Pasteur de Lille, and INSERM, and by grants from the Ligue contre le Cancer, comité Nord, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Fondation Recherche Médicale, Comité Nord-Pas de Calais, and Agence Nationale de la Recherche, Young Investigator Program. B. F. was supported by a Institut Pasteur/Région Nord-Pas de Calais fellowship and F. A. by a grant from the French Research and Technology Minister. Financial support was given to K. R. by the Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant SFB 617 and the Center of Excellence program Inflammation at Interfaces.

REFERENCES

- Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., and Vande Woude, G. F. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915–925.
- Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., and Birchmeier, C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376, 768–771.
- Borowiak, M., Garratt, A. N., Wustefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C., and Birchmeier, C. (2004). Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 10608–10613.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A., and Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell* 5, 207–216.
- Comoglio, P. M., Giordano, S., and Trusolino, L. (2008). Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 504–516.
- Crepaldi, T., Prat, M., Giordano, S., Medico, E., and Comoglio, P. M. (1994). Generation of a truncated hepatocyte growth factor receptor in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 269, 1750–1755.
- De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38, 9–12.
- Deheuninck, J., Foveau, B., Goormachtigh, G., Leroy, C., Ji, Z., Tulasne, D., and Fafeur, V. (2008). Caspase cleavage of the MET receptor generates an HGF interfering fragment. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 367, 573–577.
- Di Renzo, M. F., *et al.* (1995). Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 1, 147–154.
- Foveau, B., Leroy, C., Ancot, F., Deheuninck, J., Ji, Z., Fafeur, V., and Tulasne, D. (2007). Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ.* 14, 752–764.
- Galarzy, R. E., Grobelny, D., Foellmer, H. G., and Fernandez, L. A. (1994). Inhibition of angiogenesis by the matrix metalloprotease inhibitor N-[2R-2-(hydroxamidocarbonylmethyl)-4-methylpentanoyl]-L-tryptophan methylamide. *Cancer Res.* 54, 4715–4718.
- Galvani, A. P., Cristiani, C., Carpinelli, P., Landonio, A., and Bertolero, F. (1995). Suramin modulates cellular levels of hepatocyte growth factor receptor by inducing shedding of a soluble form. *Biochem. Pharmacol.* 50, 959–966.
- Gambarotta, G., Boccaccio, C., Giordano, S., Ando, M., Stella, M. C., and Comoglio, P. M. (1996). Ets up-regulates MET transcription. *Oncogene* 13, 1911–1917.
- Giordano, S., Di Renzo, M. F., Narsimhan, R. P., Cooper, C. S., Rosa, C., and Comoglio, P. M. (1989). Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene. *Oncogene* 4, 1383–1388.
- Hammond, D. E., Carter, S., McCullough, J., Urbe, S., Vande Woude, G., and Clague, M. J. (2003). Endosomal dynamics of Met determine signaling output. *Mol. Biol. Cell* 14, 1346–1354.
- Herreman, A., Serneels, L., Annaert, W., Collen, D., Schoonjans, L., and De Strooper, B. (2000). Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 2, 461–462.
- Huovila, A. P., Turner, A. J., Pelto-Huikko, M., Karkkainen, I., and Ortiz, R. M. (2005). Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem. Sci.* 30, 413–422.
- Ivan, M., Bond, J. A., Prat, M., Comoglio, P. M., and Wynford-Thomas, D. (1997). Activated ras and ret oncogenes induce over-expression of c-met (hepatocyte growth factor receptor) in human thyroid epithelial cells. *Oncogene* 14, 2417–2423.
- Jeffers, M., Taylor, G. A., Weidner, K. M., Omura, S., and Vande-Woude, G. F. (1997). Degradation of the Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol. Cell. Biol.* 17, 799–808.
- Kawaida, K., Matsumoto, K., Shimazu, H., and Nakamura, T. (1994). Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4357–4361.
- Kopitz, C., *et al.* (2007). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Res.* 67, 8615–8623.
- Landman, N., and Kim, T. W. (2004). Got RIP? Presenilin-dependent intramembrane proteolysis in growth factor receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 337–351.
- Longati, P., Bardelli, A., Ponzetto, C., Naldini, L., and Comoglio, P. M. (1994). Tyrosines1234–1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene* 9, 49–57.
- Maina, F., Hilton, M. C., Ponzetto, C., Davies, A. M., and Klein, R. (1997). Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes Dev.* 11, 3341–3350.
- Mak, H. H., Peschard, P., Lin, T., Naujokas, M. A., Zuo, D., and Park, M. (2007). Oncogenic activation of the Met receptor tyrosine kinase fusion protein, Tpr-Met, involves exclusion from the endocytic degradative pathway. *Oncogene* 26, 7213–7221.
- Migliore, C., and Giordano, S. (2008). Molecular cancer therapy: can our expectation be MET? *Eur. J. Cancer* 44, 641–651.
- Mondino, A., Giordano, S., and Comoglio, P. M. (1991). Defective posttranslational processing activates the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor). *Mol. Cell. Biol.* 11, 6084–6092.
- Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Saxena, M. T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D. J., Ray, W. J., and Kopan, R. (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol. Cell* 5, 197–206.
- Nath, D., Williamson, N. J., Jarvis, R., and Murphy, G. (2001). Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase. *J. Cell Sci.* 114, 1213–1220.
- Ni, C. Y., Murphy, M. P., Golde, T. E., and Carpenter, G. (2001). gamma-Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 294, 2179–2181.
- Park, M., Dean, M., Cooper, C. S., Schmidt, M., O'Brien, S. J., Blair, D. G., and Vande Woude, G. F. (1986). Mechanism of met oncogene activation. *Cell* 45, 895–904.
- Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzzone, M., Giordano, S., and Comoglio, P. M. (2003). Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 3, 347–361.

- Peschard, P., Fournier, T. M., Lamorte, L., Naujokas, M. A., Band, H., Langdon, W. Y., and Park, M. (2001). Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol. Cell* 8, 995–1004.
- Peschard, P., Ishiyama, N., Lin, T., Lipkowitz, S., and Park, M. (2004). A conserved DpYR motif in the juxtamembrane domain of the Met receptor family forms an atypical c-Cbl/Cbl-b tyrosine kinase binding domain binding site required for suppression of oncogenic activation. *J. Biol. Chem.* 279, 29565–29571.
- Petrelli, A., Circosta, P., Granziero, L., Mazzone, M., Pisacane, A., Fenoglio, S., Comoglio, P. M., and Giordano, S. (2006). Ab-induced ectodomain shedding mediates hepatocyte growth factor receptor down-regulation and hampers biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 5090–5095.
- Petrelli, A., Gilestro, G. F., Lanzardo, S., Comoglio, P. M., Migone, N., and Giordano, S. (2002). The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* 416, 187–190.
- Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graaziani, A., Panayotou, G., and Comoglio, P. M. (1994). A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 77, 261–271.
- Ponzetto, C., Giordano, S., Peverali, F., Della Valle, G., Abate, M. L., Vaula, G., and Comoglio, P. M. (1991). c-met is amplified but not mutated in a cell line with an activated met tyrosine kinase. *Oncogene* 6, 553–559.
- Pozner-Moulis, S., Pappas, D. J., and Rimm, D. L. (2006). Met, the hepatocyte growth factor receptor, localizes to the nucleus in cells at low density. *Cancer Res.* 66, 7976–7982.
- Prat, M., Crepaldi, T., Gandino, L., Giordano, S., Longati, P., and Comoglio, P. (1991). C-terminal truncated forms of Met, the hepatocyte growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5954–5962.
- Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., and Birchmeier, C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699–702.
- Schmidt, L., *et al.* (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat. Genet.* 16, 68–73.
- Slack, B. E., Ma, L. K., and Seah, C. C. (2001). Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor- α converting enzyme. *Biochem. J.* 357, 787–794.
- Struhl, G., and Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol. Cell* 6, 625–636.
- Tulasne, D., Deheuninck, J., Lourenco, F. C., Lamballe, F., Ji, Z., Leroy, C., Puchois, E., Moumen, A., Maina, F., Mehlen, P., and Fafeur, V. (2004). Pro-apoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10328–10339.
- Tulasne, D., and Foveau, B. (2008). The shadow of death on the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ* 15, 427–434.
- Tulasne, D., Paumelle, R., Weidner, K. M., Vandenbunder, B., and Fafeur, V. (1999). The multisubstrate docking site of the MET receptor is dispensable for MET-mediated RAS signaling and cell scattering. *Mol. Biol. Cell* 10, 551–565.
- Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shlota, K., Kuno, J., Noda, T., and Kitamura, N. (1995). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373, 702–705.
- Wajih, N., Walter, J., and Sane, D. C. (2002). Vascular origin of a soluble truncated form of the hepatocyte growth factor receptor (c-met). *Circ. Res.* 90, 46–52.
- Weidner, K. M., Sachs, M., and Birchmeier, W. (1995). Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2597–2601.
- Yant, J., Buluwela, L., Niranjana, B., Gusterson, B., and Kamalati, T. (1998). In vivo effects of hepatocyte growth factor/scatter factor on mouse mammary gland development. *Exp. Cell Res.* 241, 476–481.
- Zhang, L., Song, L., and Parker, E. M. (1999). Calpain inhibitor I increases beta-amyloid peptide production by inhibiting the degradation of the substrate of gamma-secretase. Evidence that substrate availability limits beta-amyloid peptide production. *J. Biol. Chem.* 274, 8966–8972.

III- L'élitage n'induit pas une mais deux voies de dégradation de Met

A- Contexte de l'étude

Nos précédents travaux démontrent qu'en absence de ligand, le récepteur subit un double clivage séquentiel à la membrane qui aboutit à la libération d'un fragment intracellulaire cytosolique rapidement dégradé par le protéasome. En revanche, il est bien documenté qu'en présence de ligand, le récepteur pleine longueur est internalisé et aiguillé jusqu'au lysosome pour y être dégradé. Ces deux voies sont donc bien distinctes puisqu'elles impliquent des compartiments de dégradation différents.

En utilisant un inhibiteur du lysosome, j'ai effectivement pu observer que la dégradation du récepteur activé par l'HGF/SF est inhibée. Cependant, j'ai également observé une stabilisation de fragments C-terminaux de Met. L'inhibition du lysosome a donc mis en évidence l'existence de fragments de Met destinés au lysosome. Ce mécanisme semble différent de la voie de dégradation dépendante du ligand qui implique des récepteurs pleine longueur mais également différent de la voie PS-RIP qui dégrade Met *via* le protéasome. J'ai donc entamé une nouvelle étude sur l'origine et le devenir de ces fragments de Met.

B- Résumé de l'étude : élitage et dégradation lysosomale de Met

En présence d'inhibiteur du lysosome, les fragments intracellulaires de Met sont donc observés aux alentours de 55 kDa, je les ai baptisés lyso-Met-CTF pour les distinguer des fragments Met-CTF du PS-RIP. Cependant, j'ai constaté que les lyso-Met-CTF sont très semblables aux Met-CTF, ils ont des tailles similaires et sont générés indépendamment de la stimulation par l'HGF/SF (Fig.1). De plus, en utilisant les chimères Trk-Met clivable et non clivable par le PS-RIP, j'ai pu démontrer que les fragments lyso-Met-CTF sont également issus de l'élitage de Met.

La suite de l'étude m'a permis de montrer que les fragments lyso-Met-CTF, bien qu'issus de l'élitage, étaient des intermédiaires d'une nouvelle voie de dégradation de Met. Tout d'abord, le lyso-Met-CTF n'est pas pris en charge par le complexe γ -secrétase (Fig.2). Puis, tandis que le fragment Met-NTF du PS-RIP est libéré dans le milieu extracellulaire, le lyso-Met-NTF est lui retrouvé à l'intérieur de la cellule (Fig.3). J'ai alors proposé que le récepteur puisse être internalisé avant d'être élagué, les fragments Met-NTF et Met-CTF seraient ensuite dégradés par le lysosome. Le dernier élément confirmant l'existence d'une

nouvelle voie de dégradation de Met est que les fragments C-terminaux de Met ont des localisations différentes ; le Met-CTF du PS-RIP est détecté à la membrane plasmique alors que le lyso-Met-CTF est localisé dans les lysosomes (Fig.4). Ainsi, j'ai mis en évidence que le récepteur est dégradé par la voie PS-RIP et par une nouvelle voie impliquant le lysosome. En inhibant simultanément le complexe γ -secrétase et le lysosome, j'ai également observé une synergie dans l'accumulation de fragments C-terminaux, ce qui suggère une coopération des deux voies dans la dégradation de Met (Fig.5).

Comme les voies PS-RIP et lysosomale impliquent toutes deux l'élagage, je me suis demandé si l'anticorps DN30, qui est capable de favoriser le PS-RIP, serait également capable d'induire la dégradation lysosomale. L'utilisation des inhibiteurs du lysosome et du complexe γ -secrétase ont tout deux montré une augmentation des fragments en présence de DN30, cet anticorps permet donc d'induire les deux voies de dégradation de Met indépendantes du ligand (Fig.6).

Nous avons soumis cette étude à la revue *Oncogene*. Il y a été souligné l'intérêt de l'étude, cependant le manuscrit n'a pas été accepté. Il manquait notamment les conditions physiologiques ou pathologiques durant lesquelles les fragments de Met pourraient s'accumuler et ainsi avoir une implication fonctionnelle. Dans une précédente étude, aucun fragment C-terminal de Met n'avait été détecté dans les hépatocytes et les neurones corticaux de souris, démontrant l'absence d'accumulation de fragment de Met dans ces conditions physiologiques (Tulasne et al., 2004). Cependant, nous avons montré que les fragments C-terminaux de Met étaient stabilisés dans des lignées tumorales comme les MDA-MB231, des cellules d'adénocarcinome mammaires métastatiques. Nous avons alors évalué la présence de fragments de Met dans des modèles de xénogreffe de souris. Les cellules MDA-MB231 ainsi que les cellules NCI-H69, des cellules de carcinome pulmonaires, ont été injectées dans les flancs de souris et les extraits issus de tumeurs induites ont été analysés en Western-Blot. Dans chacune des tumeurs, des fragments C-terminaux de Met ont été détectés, parfois à des niveaux équivalents aux récepteurs pleine longueur eux-mêmes (Fig.7). Les conditions tumorales favorisent donc l'accumulation des Met-CTF et ce sans traitement inhibant les voies de dégradation. De plus, nous avons reconstitué le fragment Met-CTF en fusionnant les domaines intramembranaire et intracellulaire de Met avec un peptide signal afin d'exprimer cette construction à la membrane plasmique. De façon intéressante, ce fragment présente une phosphorylation constitutive et induit la transformation des fibroblastes aussi efficacement

que TPR-Met, une forme oncogénique du récepteur. L'ensemble de ces travaux sont compilés dans un article en préparation (voir **Publication 4**).

Ainsi, nous avons mis en évidence une seconde voie de dégradation de Met en absence de ligand. Contrairement au PS-RIP, cette voie lysosomale nécessite l'internalisation du récepteur, celui-ci est alors élagué et les fragments générés sont dégradés par le lysosome. Des fragments C-terminaux de Met sont constitutivement présents dans des xénogreffes de souris et l'expression d'une construction similaire permet de transformer des fibroblastes. Les voies lysosomale et PS-RIP permettent donc la dégradation de fragments potentiellement délétères de Met.

Publication 4 : Shedding-generated Met receptor fragments can be routed to either the proteasomal or the lysosomal degradation pathway.

Ancot F., Leroy C., Lemièrre A., Muharram G., Lefebvre J., Kherrouche Z., Foveau B., Giordani S., Chotteau-Lelièvre A, Tulasne D.

Shedding-generated Met receptor fragments can be routed to either the proteasomal or the lysosomal degradation pathway

Frédéric ANCOT¹, Catherine LEROY¹, Ghaffar MUHARRAM¹, Arnaud LEMIERE¹, Jonathan LEFEBVRE¹, Zoulika KHERROUCHE¹, Bénédicte FOVEAU¹, Albin POURTIER¹, Silvia GIORDANO², Anne CHOTTEAU-LELIEVRE¹ and David TULASNE¹.

¹ CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille - Institut Pasteur de Lille - Université de Lille 1 - Université de Lille 2, Lille cedex, France.

² Division of Molecular Oncology, Institute for Cancer Research and Treatment (IRCC), University of Turin Medical School, 10060 Candiolo, Italy;

Running title: *Lysosomal degradation of Met*. Keywords: *c-Met*, *receptor tyrosine kinase*, *hepatocyte growth factor*, *lysosome*, *γ -secretase*, *shedding*, *degradation*.

Abstract

The receptor tyrosine kinase Met and its ligand, the hepatocyte growth factor/scatter factor, are essential to embryonic development, whereas deregulation of Met signaling pathways is associated with tumorigenesis and metastasis. The most frequent alteration is receptor and/or ligand overexpression, leading to aberrant activation of the pathways. The Presenilin-Regulated Intramembrane Proteolysis (PS-RIP) is involved in downregulation of Met. This proteolytic process involves shedding of the Met extracellular domain followed by γ -secretase cleavage, generating labile intracellular fragments that are then degraded by the proteasome. We demonstrate here that C-terminal fragments generated by ectodomain shedding can escape γ -secretase cleavage through direct degradation via the lysosomal pathway. In contrast to PS-RIP, this process requires internalization of the receptor and trafficking to the lysosomal compartment. The two downregulation pathways are complementary, since their simultaneous inhibition induces synergistic accumulation of C-terminal Met fragments. In addition, the DN30 monoclonal antibody inducing Met shedding promotes receptor degradation through induction of both PS-RIP and the lysosomal pathway. Interestingly, we observed accumulation of Met C-terminal fragments in tumor xenograft model without any treatment. In addition, expression of a membrane-bound C-terminal Met fragment was able to induce fibroblast transformation comparable to that induced by TPR-Met, a constitutively active form of Met. We thus demonstrate that ligand-independent downregulation of Met involves a novel lysosomal degradation pathway preventing accumulation of deleterious fragments.

Introduction

Met is a receptor tyrosine kinase (RTK) expressed predominantly in cells of epithelial origin. It is activated by its stromal ligand, the hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) (Birchmeier et al., 2003). HGF/SF and Met are essential to embryonic development, since knock-out of either one affects placenta, liver, muscle, and neuron formation (Bladt et al., 1995; Maina et al., 1997; Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995). In adults, the HGF/SF-Met pair is involved in physiological processes like mammary gland development (Yant et al., 1998), wound healing, and kidney or liver regeneration (Borowiak et al., 2004; Kawaida et al., 1994). *In vitro*, ligand-activated Met stimulates proliferation, scattering, invasion, and morphogenesis of epithelial cells, acts as an angiogenic factor, and has chemoattractant and neurotrophic activities (Birchmeier et al., 2003).

Upon ligand binding and subsequent dimerization of Met, several tyrosine residues in the intracellular portion become phosphorylated, allowing recruitment of cytoplasmic proteins involved in activating multiple intracellular signaling pathways (Longati et al., 1994; Ponzetto et al., 1994).

Aberrant Met and HGF/SF signaling are involved in promoting tumorigenesis and metastasis. A direct link between Met and cancer has been evidenced by characterization of a receptor activating mutations in the germline of patients affected by hereditary papillary renal carcinoma (Jeffers et al., 1997a). In a significant

number of human cancers, HGF/SF and Met are overexpressed (Birchmeier et al., 2003). Ligand-independent activation of the Met tyrosine kinase can also occur. It is typically observed in cells expressing high levels of receptor and leads to spontaneous dimerization and subsequent activation (Ponzetto et al., 1991).

Downregulation of the HGF/SF-activated receptor is an essential negative regulatory mechanism preventing receptor oversignaling. Upon Met activation, the juxtamembrane tyrosine residue 1003 is phosphorylated, allowing interaction with the E3 ubiquitin ligase CBL (Peschard et al., 2001). This recruitment leads to ubiquitination of the receptor and causes the intracellular trafficking of Met and its degradation in the lysosomal compartment (Hammond et al., 2001; Jeffers et al., 1997b; Petrelli et al., 2002). Uncoupling of Met- from Cbl-mediated ubiquitination, either through loss of the juxtamembrane domain or by mutation of the tyrosine residue acting as a Cbl docking site, leads to cell transformation (Abella et al., 2005; Carter et al., 2004; Peschard et al., 2001).

We previously demonstrated that in the absence of ligand stimulation, Met is downregulated following proteolytic cleavages. Under apoptotic conditions, Met is cleaved by caspases, which separate the extracellular ligand-binding domain from the intracellular kinase domain; the generated cytoplasmic fragment (p40 Met) is involved in apoptosis amplification (Deheuninck et al., 2008; Foveau et al., 2007; Tulasne et al., 2004; Tulasne & Foveau, 2008). We have also demonstrated that MET is processed by

PS-RIP (Presenilin-Regulated Intramembrane Proteolysis) (Foveau et al., 2009). MET is cleaved within its extracellular juxtamembrane domain by membrane metalloproteases. As silencing of ADAM10 in NIH 3T3 cells or of ADAM17 in MCF-10A cells only partially inhibits this cleavage, several metalloproteases seem to be involved (Foveau et al., 2009; Kopitz et al., 2007). This cleavage generates soluble N-terminal fragments (Met-NTF), which are shed into the extracellular space, and membrane-anchored C-terminal fragments (Met-CTF) (Galvani et al., 1995; Jeffers et al., 1997b; Prat et al., 1991; Wajih et al., 2002). The latter are in turn cleaved at the membrane by the γ -secretase complex, of which presenilin is the catalytic subunit. The generated remnant intracellular domains of Met (Met-ICD) are released into the cytosol and degraded by the proteasome (Foveau et al., 2009). We have demonstrated that constitutive cleavage by PS-RIP and further degradation of the Met intracellular domains contribute to decreasing the half-life of the receptor and to preventing its accumulation in the membrane (Foveau et al., 2009).

Numerous membrane receptors are cleaved by PS-RIP, including at least six RTKs (Ancot et al., 2009). In most cases, these sequential cleavages downregulate RTK expression, through generation of a labile intracellular fragment degraded by the proteasome. This has been evidenced for the EphB2, IGF1, Tie1, and CSF receptors (Litterst et al., 2007; Marron et al., 2007; McElroy et al., 2007; Wilhelmsen & van der Geer, 2004). In addition, intracellular fragments generated from ErbB4 and Ryk can translocate to the nucleus and bind to transcriptional repressors

or activators to regulate gene expression (Lyu et al., 2009; Rio et al., 2000; Sardi et al., 2006).

We here demonstrate that the fragments generated by ectodomain shedding can escape γ -secretase processing through direct lysosomal degradation. This pathway constitutes a novel ligand-independent degradation mechanism participating in downregulation of Met and preventing accumulation of transforming fragments.

Results

Inhibition of lysosomal degradation leads to generation of Met C-terminal fragments

The human mammary epithelial cell line MCF-10A was treated with HGF/SF for different times in the presence or absence of bafilomycin A1, an H⁺-pump (V-ATPase) inhibitor well known to prevent lysosomal degradation (Yoshimori et al., 1991). Met receptor expression was evaluated on western blots probed with an antibody against its kinase domain. As expected, HGF/SF stimulation induced Met phosphorylation, followed by its degradation, more than half of the receptor being degraded upon stimulation for 2 hours (Fig. 1A). Bafilomycin A1 prevented Met degradation, confirming the lysosome-dependent downregulation of Met upon ligand stimulation (Hammond et al., 2001). Interestingly, we observed additional fragments in bafilomycin-A1-treated samples, ranging in size from 55 to 60 kDa, whether HGF/SF was present or not (Fig. 1A). This suggests that Met C-terminal fragments

(Lyso-Met-CTF) are generated and degraded by the lysosome, independently of ligand stimulation.

HGF/SF-stimulated Met degradation was prevented by a selective Met kinase inhibitor (Fig. 1B), demonstrating the requirement of the Met kinase activity for ligand-dependent degradation. In contrast, C-terminal fragments were detected in bafilomycin-A1-treated samples whether HGF/SF or the Met kinase inhibitor was present or not. Similar Met C-terminal fragments were stabilized with concanamycin A, another H⁺-pump inhibitor, in various epithelial cell lines, including the kidney epithelial cell line MDCK, the mammary cell line MCF-10A, the lung tumor cell line A549, and the cervical tumor cell line Hela (Fig. 1C). When Met expression was silenced in MCF-10A cells with a specific siRNA, the band corresponding to full-length Met was markedly reduced and no bands appeared in the 55- to 60-kDa range. This confirms that the fragments stabilized by lysosome inhibitors are indeed fragments of Met (Fig 1D).

Altogether, these results indicate that the lysosomal compartment is involved not only in ligand-dependent downregulation of Met, but also in the degradation of Met C-terminal fragments. In contrast to the previously described lysosomal degradation of full-length Met, the generation and degradation of Met C-terminal fragments does not depend on ligand stimulation or Met kinase activity.

Met C-terminal fragments are generated by shedding but escape γ -secretase processing

The molecular weights of the Met C-terminal fragments stabilized by lysosome inhibitors suggest the release of the extracellular domain of MET and are reminiscent of those

generated upon Met shedding (Foveau et al., 2009). To determine whether these fragments are generated upon cleavage of Met within the extracellular juxtamembrane region, we looked for Met C-terminal fragments in cells expressing either an uncleavable chimeric receptor (uncleavable TRK-Met, in which the entire extracellular domain of Met is replaced with the extracellular domain of the TRKA receptor), or a cleavable chimera in which the first 50 juxtamembrane extracellular amino acids of Met are present (cleavable TRK-Met) (Fig. 2A) (Foveau et al., 2009). As previously shown, because of its high rate of shedding, the full-length form of cleavable TRK-Met was found at a lower level than the uncleavable TRK-Met (Fig. 2B). As expected, treatment with the γ -secretase inhibitor stabilized MET C-terminal fragments only in cells expressing the cleavable TRK-Met. Treatment with lysosomal inhibitors likewise stabilized C-terminal fragments in cells expressing the cleavable TRK-Met but not in those expressing TRK-Met (Fig. 2B). This demonstrates that shedding of the extracellular domain is a prerequisite to generation of lysosomally degraded fragments.

As previously shown, treatment of epithelial cells with proteasome inhibitors stabilized the 50 kDa Met intracellular domain (Met-ICD) (Foveau et al., 2009). Further treatment with γ -secretase inhibitors stabilized the Met C-terminal fragments at about 55 kDa, at the expense of Met-ICD, demonstrating sequential cleavage of Met by PS-RIP and further degradation by the proteasome (Fig. 2C) (Foveau et al., 2009). In contrast, co-treatment of the cells with lysosome and proteasome inhibitors stabilized both Met-ICD

and Met-CTF, demonstrating that the Met C-terminal fragments degraded by the lysosome escape γ -secretase cleavage. Similar results were obtained with MDCK cells expressing cleavable TRK-Met (Fig. 2B).

Altogether, our results suggest that the Met C-terminal fragments generated upon shedding of the N-terminal part of the receptor can be degraded by two processes: (i) direct lysosomal degradation and (ii) further cleavage by γ -secretase, generating Met-ICD, which in turn is degraded by the proteasome.

Shedding by internalized Met leads to its direct lysosomal degradation

It is well known that the shedding process involves the generation of N-terminal fragments of about 100 kDa which, being released into the extracellular medium, are undetectable in the intracellular compartment. As expected, Met C-terminal fragments (detected with antibody against the C-terminal domain of the receptor) appeared stabilized in lysates of HeLa cells treated with either a γ -secretase or a lysosome inhibitor, whereas an antibody raised against the Met N-terminal domain failed to detect this domain in lysates of untreated or γ -secretase-inhibitor-treated cells (Fig. 3A). In contrast, we detected a Met N-terminal fragment of about 100 kDa in bafilomycin-A1-treated cell lysates, suggesting that both the N- and C-terminal fragments of Met are generated within the cell and degraded by the lysosome. This result is consistent with previous data describing detection of a similar N-terminal fragment of about 100 kDa in HeLa cells treated with a lysosome inhibitor (Hammond et al., 2001).

To determine whether the Met N-terminal fragments were generated from the full-length receptor expressed at the cell surface, we stained extracellular proteins with an impermeable biotinylating reagent. The Met receptor was then immunoprecipitated from the cell lysate and revealed either with antibody against the N-terminal domain of Met or with streptavidin-HRP, which recognizes biotinylated proteins. As expected, in both whole-cell lysates and immunoprecipitates, western blotting with anti-Met antibody revealed full-length forms of the receptor in all the samples and Met N-terminal fragments only in cells treated with bafilomycin A1 (Fig. 3A). In the immunoprecipitates, streptavidin-HRP detection revealed the full-length mature form of Met, consistently with staining of membrane-expressed proteins. In addition, a 100-kDa fragment was observed under all conditions, the corresponding band being more pronounced after bafilomycin A1 treatment. This confirms that the Met N-terminal fragments are generated from membrane-anchored Met receptor (Fig. 3B). The detection of biotinylated Met N-terminal fragments even without lysosome inhibition suggests that biotinylation could inhibit lysosomal degradation. Our results demonstrate that ectodomain shedding can generate N- and C-terminal fragments that are both degraded in the lysosomal compartment.

We next performed immunofluorescence to reveal the subcellular location of the Met fragments stabilized with either γ -secretase or lysosome inhibitors. Without treatment, immunofluorescence staining with antibody against the kinase domain of Met revealed receptor mainly at the membrane, with weak perinuclear staining

likely corresponding to neo-synthesized Met in the endoplasmic reticulum (Fig.4). Inhibition of γ -secretase led to a slight increase in membrane staining, confirming that the Met C-terminal fragments stabilized under these conditions are anchored to the cytoplasmic side of the membrane. In contrast, inhibition of lysosomal degradation led to detection of Met in intra-cytoplasmic vesicles. The intracellular Met staining co-localized with anti-Lamp-1 staining, a lysosomal marker (Fig. 4). These results confirm that the Met C-terminal fragments stabilized by γ -secretase and lysosome inhibitors display different localizations: a membrane localization in the first case and a lysosomal localization in the second. Similar results were obtained with an anti-Met antibody directed against the N-terminal region of Met, demonstrating that this region is also degraded through the lysosomal pathway (data not shown).

We previously demonstrated that the shedding process generates N-terminal fragments, released into the medium, and a membrane-anchored Met C-terminal fragment, further cleaved by γ -secretase (Foveau et al., 2009). We now demonstrate that this initial cleavage of Met can also generate both N- and C-terminal fragments that are directly degraded in the lysosomal compartment.

The lysosomal and γ -secretase degradation pathways cooperate in Met degradation

Since Met C-terminal fragments can be degraded either in the lysosome or, upon γ -secretase cleavage, by the proteasome, we assessed whether these degradation pathways might cooperate. Met C-terminal fragment stabilization

was evaluated in MDCK, HeLa, MCF-10A and MDA-MB 231 cells treated with a lysosome inhibitor, a γ -secretase inhibitor, or both. In MDCK and HeLa cells, similar amounts of Met C-terminal fragments were stabilized by treatment with either inhibitor, while co-treatment induced synergistic stabilization (Fig. 5A). Similar cooperation was observed in MDCK cells expressing cleavable TRK-Met, but no C-terminal fragments were detected in cells expressing uncleavable TRK-Met (Fig. 5B). This indicates that both pathways cooperate to degrade Met C-terminal fragments in these epithelial cells.

In MCF-10A cells, the lysosome inhibitor efficiently induced Met C-terminal fragment stabilization, while γ -secretase inhibition led to minor stabilization (Fig 5A, right panels). In mouse embryonic fibroblasts (MEF), on the contrary, the lysosome inhibitor did not induce fragment stabilization, but C-terminal fragments were readily detected in presenilin-1- and presenilin-2-deficient MEFs, where the γ -secretase complex is not functional (Fig. 5C). In these cells, however, further treatment with the lysosome inhibitor increased the generation of Met C-terminal fragments, providing genetic evidence for cooperation between the γ -secretase and lysosomal pathways.

Our results thus demonstrate that both pathways cooperate to degrade C-terminal Met receptor fragments and that the routing of these fragments varies according to the cell type. In some cell types, targeting to the lysosome appears to predominate.

DN30-mAb-induced Met degradation through the lysosomal and γ -secretase pathways

The mAb DN30, directed against the extracellular region of human Met, is known to induce ectodomain shedding from the Met receptor (Petrelli *et al.*, 2006). In addition, we have demonstrated that Met downregulation by DN30 involves PS-RIP with γ -secretase cleavages and proteasomal degradation (Foveau et al 2009). This inhibitory antibody thus hampers the ligand-independent biological activity triggered by overexpressed Met including neoplastic transformation and tumor growth.

Having demonstrated that MET C-terminal fragments can be directly degraded by lysosomes, we evaluated the involvement of this degradation pathway in DN30-induced Met downregulation. Treatment of MCF-10A cells with the antagonistic DN30 antibody induced Met downregulation with a concomitant increase of Met C-terminal fragments stabilized by either a lysosome or a γ -secretase inhibitor (Fig. 6). Co-treatment with both inhibitors strongly increased the amount of Met C-terminal fragments appearing in response to DN30 (Fig. 6). Thus, the induction of Met shedding by this antibody promotes the generation of Met C-terminal fragments, which are degraded both via the lysosomal pathway and through γ -secretase cleavage.

Accumulation of Met C-terminal fragment in tumor xenograft models

In order to find physiological conditions in which Met C-terminal fragments could accumulate without their stabilization upon inhibition of the degradation pathways, we evaluate full length Met

and fragments expression in different mouse organs. Met C-terminal fragments were not detected in all tested mice organs including liver, lung and neurons (data not shown). Since the C-terminal fragments are generated in human transformed cell lines, we evaluated fragments generation in experimental tumorigenesis. Human transformed cell lines NCI-H69 and MDA-MB231 were inoculated subcutaneously into the posterior flank of immunodeficient nude female mice. After 4 weeks, tumors were excised and extracts were analyzed by Western blot. In addition of full length Met receptor, C-terminal fragments ranging in size from 55 to 60 kDa were detected with antibodies against C-terminal domain (Fig. 7) or kinase region of human Met (data not shown). For two tumor samples, the amount of Met C-terminal fragments was much higher than the full length Met. This indicates that Met C-terminal fragments can accumulate in tumors xenografts without any treatment.

Overexpression of Met C-terminal fragments induces cell transformation

It is well documented that aberrant activation of Met kinase activity leads to cell transformation, for instance through constitutive dimerization as in the case of the TPR-Met fusion protein (Cooper et al., 1984). Interestingly, the C-terminal region of MET, devoid of the extracellular domain but containing the intracellular kinase domain, also displays constitutive tyrosine phosphorylation and induces cell transformation (Amicone et al., 1997; Merlin et al., 2009; Wallenius et al., 2000). To evaluate the transforming properties of the Met C-terminal

fragments generated upon shedding, we reconstituted a membrane-anchored Met C-terminal fragment by fusing the signal peptide of Met to its transmembrane and cytoplasmic regions. NIH3T3 fibroblasts were transfected with a construct encoding the oncogenic TPR-Met fusion protein or the Met C-terminal fragment. Each encoded protein was detected at the expected molecular weight and displayed constitutive phosphorylation of the tyrosine residues of the kinase domain (Fig. 8A). Both proteins induced formation of foci in a comparable manner in confluent layers of NIH3T3 cells (Fig. 8B). This demonstrates that, like TPR-Met, Met C-terminal fragments are constitutively activated and induce fibroblast transformation. Thus, both direct degradation of these fragments in the lysosome and their cleavage by γ -secretase followed by proteasome degradation could be mechanisms efficiently preventing accumulation of deleterious fragments.

Discussion

The degradation of receptor tyrosine kinases is a crucial process downregulating the activity of these receptors and preventing their deleterious activation. The Met receptor, like other RTKs, can be degraded either in response to ligand activation or in a constitutive manner, independently of any stimulation. In response to HGF/SF, Met becomes activated and phosphorylated, this leading to its ubiquitination, internalization, and trafficking from clathrin-coated pit vesicles to late endosomal

compartments. The full-length receptor is then degraded within the lysosome (Hammond et al., 2001). Defects in this process lead to oversignaling, indicating that ligand-dependent degradation of Met allows attenuation of receptor responses (Abella et al., 2005).

We recently demonstrated that the Met receptor is also degraded independently of ligand stimulation, through presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis. This proteolytic process is initiated by ectodomain shedding, i.e. the generation of N-terminal fragments that are released into the extracellular medium and of C-terminal membrane-anchored fragments. These C-terminal fragments are then processed by the γ -secretase complex, known to cleave receptors within the transmembrane domain. The generated intracellular domain of Met is, in turn, degraded by the proteasome. In contrast to HGF/SF-induced degradation, PS-RIP is constitutive and does not involve Met kinase activity. Defects in this process also lead to oversignaling, demonstrating that constitutive degradation of Met by PS-RIP prevents unregulated Met activation (Foveau et al., 2009).

In this report, we demonstrate the existence of a second pathway involved in constitutive (ligand-independent) degradation of fragments generated through shedding: lysosomal degradation of both N- and C-terminal fragments. Whereas the Met shedding that initiates PS-RIP leads to release of the N-terminal fragment into the external medium, the N-terminal fragments involved in the new pathway can be stabilized inside the cells by treatment with a lysosome inhibitor. This suggests that PS-RIP is initiated by

Met shedding at the cell surface, but that the cleavage leading to lysosomal degradation affects intracellular Met. Accordingly, Met is found in the lysosomal compartment of lysosome-inhibitor-treated cells. In addition, biotin staining of the membrane proteins shows that the N-terminal region of Met degraded by the lysosome derives from a membrane-anchored receptor. Thus, membrane-bound full-length Met can be internalized and then cleaved within the juxtamembrane region. This intracellular shedding leads to generation of both N- and C-terminal fragments, which are in turn degraded in the lysosome. In keeping with this view, the Met C-terminal fragments generated by intracellular shedding escape processing by the γ -secretase complex.

Taken together, these and previous data show that the cleavage associated with Met ectodomain shedding can initiate either direct degradation in the lysosome or classical PS-RIP leading to proteasomal degradation. We propose that routing to these two different degradation pathways depends on the subcellular localization of Met: when Met present at the cell surface sheds its ectodomain into the surrounding medium, this leads to γ -secretase cleavage of the membrane-anchored C-terminal fragment, but when Met present in intracellular vesicles is similarly cleaved, both resulting fragments undergo lysosomal degradation. Interestingly, both degradation mechanisms participate in ligand-independent downregulation of Met, and their action appears synergistic.

The N-terminal fragment released into the extracellular medium upon initiation of the Met

PS-RIP pathway can bind HGF/SF efficiently and can potentially act as a decoy (Petrelli et al., 2006; Wajih et al., 2002). In contrast, the N-terminal fragment generated by intracellular shedding and degraded in the lysosome is not released. This degradation pathway could thus allow downregulation of the MET receptor without generation of an extracellular decoy, which could improve ligand stimulation.

Although at least 15 RTKs and several type I membrane proteins are cleaved in the extracellular juxtamembrane domain (Ancot et al., 2009), direct lysosomal degradation of the generated C-terminal fragment has never been described. Routing of Met C-terminal fragments to different degradation processes thus appears as an original mechanism. Yet although in most cases of receptor shedding, the fragment that remains is then processed by γ -secretase and degraded by the proteasome, there are some receptors for which this second cleavage has not been reported. In such cases, direct lysosomal degradation of the generated fragments might be involved in their downregulation.

Although the development of inhibitory antibodies targeting the extracellular domains of membrane oncogenes is a promising therapeutic approach, the molecular mechanisms underlying the activity of such antibodies are not fully understood. We previously showed that the anti-Met antibody DN30, known to induce shedding of Met and downregulation of membrane-anchored Met, promotes its PS-RIP (Foveau et al., 2009; Petrelli et al., 2006). We demonstrate here that DN30 antibody also induces direct lysosomal degradation of Met fragments. Thus, forced

induction of Met shedding by DN30 actually targets Met to two complementary degradation pathways, which could explain the efficient degradation induced by this antagonistic antibody.

Deregulation of RTK signaling is one of the major molecular defects associated with tumorigenesis. Overexpression of the full-length RTK and the presence of activating mutations are the main defects observed in tumor samples. It is well documented, however, that truncated RTKs lacking the extracellular domain are active kinases that often display transforming properties. For instance, shedding of the ectodomain of IGFR, ErbB4, or Tie1, leads to the generation of constitutively phosphorylated membrane-tethered fragments. Nevertheless, their accumulation is prevented by γ -secretase cleavage and subsequent degradation of the fragment (Linggi et al., 2006; Marron et al., 2007; McElroy et al., 2007). In contrast, ectodomain shedding from ErbB2 is not followed by γ -secretase cleavage. Consequently, in cancer cells overexpressing ErbB2, ectodomain shedding is associated with the accumulation of membrane-anchored C-terminal ErbB2 fragments (Christianson et al., 1998), which appear to be constitutively phosphorylated (Christianson et al., 1998; Molina et al., 2001) and are associated with poor outcome among patients overexpressing ErbB2 (Saez et al., 2006). Thus, γ -secretase cleavage might be viewed as a protective cleavage preventing the generation of transforming fragments.

We report here that Met C-terminal fragments are detected in tumor extracts of human transformed cells injected in mouse. This demonstrates that Met C-terminal fragment can

accumulate in tumoral conditions without any treatment preventing their degradation. It has been previously shown that in tumor xenograft models Met N-terminal fragment are detectable in plasma of animals (Athauda et al., 2006), suggesting increase of Met receptor shedding during tumor growth. This could correlate with abundance of metalloprotease in tumor stroma (Kessenbrock et al.).

In addition, it has been shown that cytoplasmic or membrane-anchored Met C-terminal fragments can induce cell transformation (Amicone et al., 1997; Merlin et al., 2009; Wallenius et al., 2000). In keeping with this, we demonstrate that the reconstituted membrane-anchored Met C-terminal fragment displays constitutive phosphorylation and induces transformation of NIH3T3 cells as effectively as does the TPR-Met oncogene. This demonstrates that ectodomain shedding by Met generates a deleterious fragment. Hence, its efficient degradation via the lysosomal pathway or through further γ -secretase cleavage could be an efficient protective transformation-preventing mechanism.

Materials and methods

Cytokines, drugs and cell cultures

Human recombinant HGF/SF was purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA). The inhibitors of H⁺-pumps, bafilomycin A1 and concanamycin A, were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). The proteasome inhibitor lactacystin was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). The γ -secretase

inhibitor E compound was purchased from Alexis/Coger (Lausen, Switzerland). The MET kinase inhibitor PHA665752 was purchased from Calbiochem. MDCK, HeLa, MCF-10A epithelial cells and NIH-3T3 fibroblast cells were cultured as previously described (Foveau et al., 2009). A 549 cells, from epithelial lung tumor, were cultured in F-12K nutrient mixture medium (Invitrogen) with 10% FCS. MDA-MB-231 cells were cultured in DMEM - 10% FCS and NCI H69 Cells in RPMI 1640 - 10% FCS. MEF (Murine Embryonic Fibroblasts) cells, WT or deficient for Presenilin 1 and Presenilin 2 were kindly provided by Paul Saftig (Christian-Albrechts-Universität, Germany) and Bart deStrooper (VIB, the Flanders Institute for Biotechnology, Belgium).

Antibodies

Mouse monoclonal antibody directed against C-terminal domain of mouse Met (B-2), kinase domain of Met (3D4) and C-terminal domain of human Met (L41G3) were respectively purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Invitrogen and Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Rabbit antibody directed against phosphorylated tyrosine of the MET kinase domain was purchased from BioSource (Camarillo, CA). Antibody directed against extracellular region of Met (DL-21) and DN30 antibody were kindly gift by Silvia Giordano. Antibody directed against ERK2 was purchased from Santa Cruz Biotechnology. Antibody against LAMP-1 (ab24170) was purchased from Abcam (Cambridge, MA, USA). Peroxidase and rhodamine conjugated antibodies directed against rabbit and mouse IgG were

purchased from Jackson ImmunoResearch Labs (West Grove, PA, USA). Green-fluorescent Alexa fluor 488 conjugated anti-mouse IgG (H+L) and red-fluorescent Alexa fluor 594 conjugated anti-rabbit IgG (H+L) were purchased from Invitrogen.

Plasmid Constructions

The TPR-Met and the TRK-Met chimera expressing vector were respectively constructed as previously described (Foveau et al., 2009; Foveau et al., 2007). The Met-CTF expressing vector was constructed by fusion of the signal peptide to the Met C-terminal region from its transmembrane domain, in order to target the fragment at the plasma membrane. The signal peptide was amplified by PCR using human Met expression vector as template with the following primers: 5' TTCTCCACTGGATCCTGGGCACCG 3' containing the BamHI restriction site and 5' GGCCGAATTCCTCTTTACACTCCCCATT 3' containing the EcoRI restriction site. The PCR product was cut out by digestion using BamHI and EcoRI and cloned into an expressing vector pcDNA3.1 (Invitrogen). The human Met-CTF was then amplified by PCR using pRS2 human MET expression vector as template with the following primers: 5' CAGGAATTCACAGGATTGATTGCTG 3' containing the EcoRI restriction site and 5' CGCGCTCGAGCTATGATGTCTCCCAGAA 3' containing the XhoI restriction site. The PCR product was cut out by digestion using EcoRI and XhoI and cloned into the expressing vector pcDNA3.1 containing the signal peptide.

Transfections

Transient and stable transfections of MDCK cells were performed as previously described using the lipofection method (Tulasne et al., 1999).

Western blotting and immunofluorescence

Western blotting and immunofluorescence were performed as previously described (Foveau et al., 2007). For immunofluorescence, cells were incubated with a combination of a mouse antibody directed against kinase domain of Met (1 : 200) and a rabbit antibody against LAMP-1 (1 : 200). Cells were then incubated 60 min with a combination of green-fluorescent Alexa fluor 488 conjugated anti-mouse IgG (H+L) (6 mg/ml) and red-fluorescent Alexa fluor 594 conjugated anti-rabbit IgG (H+L) (6 mg/ml) (Invitrogen). Fluorescence was examined using confocal LSM 710 (Zeiss, Thornwood, NY, USA). Results are representative of at least three experiments.

Small Interfering RNA

MCF-10A cells were cultured (200 000 cells/35 mm-dish) in DMEM-10% FCS. The next day, cells were incubated for 6 h in serum-free OptiMEM, 5 µl transfectant (Lipofectamine 2000; Invitrogen) and 50 nM small interfering RNA (siRNA; Invitrogen) targeting the Met (sequence 1: 5' AAAGAUAAACCUCUCAUAAUG 3' and sequence 2: 5' CAUUAUGAGAGGUUUAUCUUU 3') or a scrambled sequence. The cells were rinsed with DMEM-10% FCS before further treatment.

Cell-Surface biotinylation

Hela cells were cultured (2 000 000 cells/100 mm-dish) in DMEM-10% FCS. The next day, the cell-surface proteins were biotinylated with the Amersham ECL Protein biotinylation module (RPN 2202) according to manufacturer's instructions (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA). Briefly, cells were incubated with 0,1 mg/ml biotinamidocaproate N-hydroxysuccinamide ester for 30 minutes on ice. The reaction was quenched by washing the cells with ice-cold PBS. The cultures were then stimulated by adding prewarmed medium (at 37°C) containing indicated inhibitors for 4h before lysis.

Tumor xenograft

The *in vivo* experiments were performed by inoculating subcutaneously 2.5×10^6 NCI-H69 and MDA-MB231 into the posterior flank of immunodeficient *nu / nu* female (or male) mice (Charles River Breeding Laboratories??). After 4 weeks, mice were sacrificed and tumors were excised. Tumors were lysed in PY buffers and subjected to Ultra Turax T8 IKA Labortechnik. Extracts were analyzed by western blot.

NIH-3T3 transformation assay

NIH-3T3 cells were cultured (50 000 cells/24mm-dish) in DMEM-10% FCS. The next day, cells were incubated for 6 h in serum-free OptiMEM, 1 µg of expression vectors and 5 µl of lipofectamin. The cells were then rinsed with DMEM-10% FCS. The next day, cells were split into 100 mm-dish DMEM-10% FCS until confluence. The cells were then incubated in DMEM-5% FCS. After three weeks, cells were

stained with blue Carazzi and foci formations were counted.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS, the Institut Pasteur de Lille, and INSERM, and by

grants from the the "Ligue contre le Cancer, comité Nord", the "Association pour la Recherche sur le Cancer", and the "Agence Nationale de la Recherche", Young investigator Program. FA was supported by the "Association pour la recherche sur le cancer" fellowship, AL by Pierre Fabre laboratories, GM by the "Agence Nationale pour la Recherche", JL by a grant from the French Research and Technology Minister.

References

- Abella JV, Peschard P, Naujokas MA, Lin T, Saucier C, Urbe S and Park M. (2005). *Mol Cell Biol*, **25**, 9632-45.
- Amicone L, Spagnoli FM, Spath G, Giordano S, Tommasini C, Bernardini S, De Luca V, Della Rocca C, Weiss MC, Comoglio PM and Tripodi M. (1997). *Embo J*, **16**, 495-503.
- Ancot F, Foveau B, Lefebvre J, Leroy C and Tulasne D. (2009). *Oncogene*, **28**, 2185-95.
- Athauda G, Giubellino A, Coleman JA, Horak C, Steeg PS, Lee MJ, Trepel J, Wimberly J, Sun J, Coxon A, Burgess TL and Bottaro DP. (2006). *Clin Cancer Res*, **12**, 4154-62.
- Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E and Vande Woude GF. (2003). *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 915-25.
- Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A and Birchmeier C. (1995). *Nature*, **376**, 768-71.
- Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, Strehle M, Trautwein C and Birchmeier C. (2004). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 10608-13.
- Carter S, Urbe S and Clague MJ. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 52835-9.
- Christianson TA, Doherty JK, Lin YJ, Ramsey EE, Holmes R, Keenan EJ and Clinton GM. (1998). *Cancer Res*, **58**, 5123-9.
- Cooper CS, Blair DG, Oskarsson MK, Tainsky MA, Eader LA and Vande Woude GF. (1984). *Cancer Res*, **44**, 1-10.
- Deheuninck J, Foveau B, Goormachtigh G, Leroy C, Ji Z, Tulasne D and Fafeur V. (2008). *Biochem Biophys Res Commun*, **367**, 573-7.
- Foveau B, Ancot F, Leroy C, Petrelli A, Reiss K, Vingetdeux V, Giordano S, Fafeur V and Tulasne D. (2009). *Mol Biol Cell*, **20**, 2495-507.
- Foveau B, Leroy C, Ancot F, Deheuninck J, Ji Z, Fafeur V and Tulasne D. (2007). *Cell Death Differ*, **14**, 752-64.
- Galvani AP, Cristiani C, Carpinelli P, Landonio A and Bertolero F. (1995). *Biochem Pharmacol*, **50**, 959-66.
- Hammond DE, Urbe S, Vande Woude GF and Clague MJ. (2001). *Oncogene*, **20**, 2761-70.
- Jeffers M, Schmidt L, Nakaigawa N, Webb CP, Weirich G, Kishida T, Zbar B and Vande Woude GF. (1997a). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11445-50.
- Jeffers M, Taylor GA, Weidner KM, Omura S and Vande Woude GF. (1997b). *Mol Cell Biol*, **17**, 799-808.
- Kawaida K, Matsumoto K, Shimazu H and Nakamura T. (1994). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4357-61.
- Kessenbrock K, Plaks V and Werb Z. *Cell*, **141**, 52-67.
- Kopitz C, Gerg M, Bandapalli OR, Ister D, Pennington CJ, Hauser S, Flechsig C, Krell HW, Antolovic D, Brew K, Nagase H, Stangl M, von Weyhern CW, Brucher BL, Brand K, Coussens LM, Edwards DR and Kruger A. (2007). *Cancer Res*, **67**, 8615-23.
- Litterst C, Georgakopoulos A, Shioi J, Ghersi E, Wisniewski T, Wang R, Ludwig A and Robakis NK. (2007). *J Biol Chem*, **282**, 16155-63.
- Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L and Comoglio PM. (1994). *Oncogene*, **9**, 49-57.
- Lyu J, Wesselschmidt RL and Lu W. (2009). *J Biol Chem*, **284**, 12940-8.
- Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, Davies AM and Klein R. (1997). *Genes Dev*, **11**, 3341-50.
- Marron MB, Singh H, Tahir TA, Kavumkal J, Kim HZ, Koh GY and Brindle NP. (2007). *J Biol Chem*, **282**, 30509-17.
- McElroy B, Powell JC and McCarthy JV. (2007). *Biochem Biophys Res Commun*, **358**, 1136-41.
- Merlin S, Pietronave S, Locarno D, Valente G, Follenzi A and Prat M. (2009). *Cancer Sci*, **100**, 633-8.

- Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J and Baselga J. (2001). *Cancer Res*, **61**, 4744-9.
- Peschard P, Fournier TM, Lamorte L, Naujokas MA, Band H, Langdon WY and Park M. (2001). *Mol Cell*, **8**, 995-1004.
- Petrelli A, Circosta P, Granziero L, Mazzone M, Pisacane A, Fenoglio S, Comoglio PM and Giordano S. (2006). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 5090-5.
- Petrelli A, Gilestro GF, Lanzardo S, Comoglio PM, Migone N and Giordano S. (2002). *Nature*, **416**, 187-90.
- Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayotou G and Comoglio PM. (1994). *Cell*, **77**, 261-71.
- Ponzetto C, Giordano S, Peverali F, Della Valle G, Abate ML, Vaula G and Comoglio PM. (1991). *Oncogene*, **6**, 553-9.
- Prat M, Crepaldi T, Gandino L, Giordano S, Longati P and Comoglio P. (1991). *Mol Cell Biol*, **11**, 5954-62.
- Rio C, Buxbaum JD, Peschon JJ and Corfas G. (2000). *J Biol Chem*, **275**, 10379-87.
- Saez R, Molina MA, Ramsey EE, Rojo F, Keenan EJ, Albanell J, Lluch A, Garcia-Conde J, Baselga J and Clinton GM. (2006). *Clin Cancer Res*, **12**, 424-31.
- Sardi SP, Murtie J, Koirala S, Patten BA and Corfas G. (2006). *Cell*, **127**, 185-97.
- Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E and Birchmeier C. (1995). *Nature*, **373**, 699-702.
- Tulasne D, Deheuninck J, Lourenco FC, Lamballe F, Ji Z, Leroy C, Puchois E, Moumen A, Maina F, Mehlen P and Fafeur V. (2004). *Mol Cell Biol*, **24**, 10328-39.
- Tulasne D and Foveau B. (2008). *Cell Death Differ*, **15**, 427-34.
- Tulasne D, Paumelle R, Weidner KM, Vandembunder B and Fafeur V. (1999). *Mol Biol Cell*, **10**, 551-65.
- Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T and Kitamura N. (1995). *Nature*, **373**, 702-5.
- Wajih N, Walter J and Sane DC. (2002). *Circ Res*, **90**, 46-52.
- Wallenius V, Hisaoka M, Helou K, Levan G, Mandahl N, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG and Jansson JO. (2000). *Am J Pathol*, **156**, 821-9.
- Wilhelmsen K and van der Geer P. (2004). *Mol Cell Biol*, **24**, 454-64.
- Yant J, Buluwela L, Niranjana B, Gusterson B and Kamalati T. (1998). *Exp Cell Res*, **241**, 476-81.
- Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M and Tashiro Y. (1991). *J Biol Chem*, **266**, 17707-12.

Figure legends

Figure 1: Stabilization of Met C-Terminal fragments by H⁺-pump inhibitor.

(A) MCF-10A cells were treated with 30 ng/ml HGF/SF in the presence and absence of 5 nM bafilomycin A1 (overnight). (B) MCF-10A cells were treated for 16 h with 300 nM pha665752 (a Met inhibitor) and/or 5 nM bafilomycin A1 and/or for 8 h with 30 ng/ml HGF. (C) MDCK, MCF-10A, A549, and HeLa cells were treated for 16 h with 10 nM concanamycin A and 5 nM bafilomycin A1. (D) MCF-10A cells were transfected with scrambled or targeting Met siRNA. The following day the cells were treated for 16 h with 10 nM concanamycin A or 5 nM bafilomycin A1. For each treatment, the same amount of protein was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies against phosphorylated residues of the Met kinase domain, antibodies against the kinase domain of Met, and antibodies against ERK2 to assess loading. The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrows indicate the positions of precursor and mature full-length Met and C-terminal Met fragments (Met-CTF).

Figure 2: Generation of MET C-terminal fragments by lysosome and γ -secretase inhibition.

(A) Schematic representation of full-length Met, uncleavable TRK-Met (consisting of the extracellular portion of TRKA fused to the transmembrane and intracellular domains of Met), and cleavable TRK-Met, possessing 50 additional amino acids of the extracellular juxtamembrane domain of MET. (B) MDCK cells expressing cleavable or uncleavable TRK-MET chimeras were treated for 5 h with 10 μ M lactacystin, for 16 h with 5 nM bafilomycin A1, or for 16 h with 1 μ M E compound. (C) MDCK cells were treated for 5 h with 10 μ M lactacystin and for 16 h with 5 nM bafilomycin A1 or for 16 h with 1 μ M E compound. For each treatment, the same amount of protein was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies directed against the C-terminal region of mouse MET (B) or the kinase domain of MET (C). Arrows indicate positions of the MET C-terminal fragments (MET-CTF) and the MET intracellular domain (MET-ICD).

Figure 3: MET shedding generates both N- and C-terminal intracellular fragments.

(A) HeLa cells were treated for 16 h with 5 nM bafilomycin A1 or 1 μ M E compound. For each treatment, the same amount of protein was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies directed against the N-terminal region and the kinase domain of Met. (B) After biotinylation of membrane proteins, HeLa cells were treated for 4 h with 5 nM bafilomycin A1 or 1 μ M E compound while control cells were neither biotinylated nor treated. The cells were then lysed and Met was immunoprecipitated with antibody against the Met N-terminal region. The proteins present in whole-cell lysates or immunoprecipitates were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by western blotting with streptavidin-HRP and with antibodies directed against the N-terminal region of Met. Arrows indicate the

positions of the C-terminal and N-terminal fragments of Met (Met-CTF or Met-NTF) and of the Met intracellular domain (Met-ICD).

Figure 4: Membrane or lysosomal localization of Met C-Terminal fragments.

MDCK cells were treated for 16 h with 1 μ M E compound or 5 nM bafilomycin A1 and were stained with an antibody against the kinase domain of Met (green) and a rabbit antibody against LAMP-1 antibody (red). The nuclei were stained with Hoëchst (blue) and overlayed photographs are shown (merge). The images, taken at 63x magnification with a confocal microscope, are representative of experiments performed in triplicate and the white arrows indicate positions of colocalized staining.

Figure 5: Stabilization of MET C-terminal fragments by inhibition of both the proteasomal and the lysosomal degradation pathway.

(A) MDCK, HeLa, and MCF-10A cells were treated for 16 h with 5 nM bafilomycin A1 and/or 1 μ M E compound. (B) MDCK cells expressing cleavable or uncleavable TRK-Met chimeras were treated for 16 h with 5 nM bafilomycin A1 and/or 1 μ M E compound. (C) Wild-type and presenilin-1- and -2-deficient MEFs (MEFs WT or PS1/2 -/-) were treated for 16 h with 5 nM bafilomycin A1 and/or 1 μ M E compound. For each treatment, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies directed against the kinase domain of Met (A) and the C-terminal end of mouse Met (B, C). Arrows indicate positions of Met C-terminal fragments (Met-CTF).

Figure 6: Induction of the lysosomal and the proteasomal degradation pathway by DN30 antibody.

MCF-10A cells were treated for 16 h with 5 nM bafilomycin A1, 1 μ M E compound, and/or 40 μ g/ml DN30 antibody (DN30) before lysis. For each treatment, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies directed against the kinase domain of Met and against ERK2. Arrows indicate the positions of the MET C-terminal fragments (Met-CTF) and of DN30 IgG.

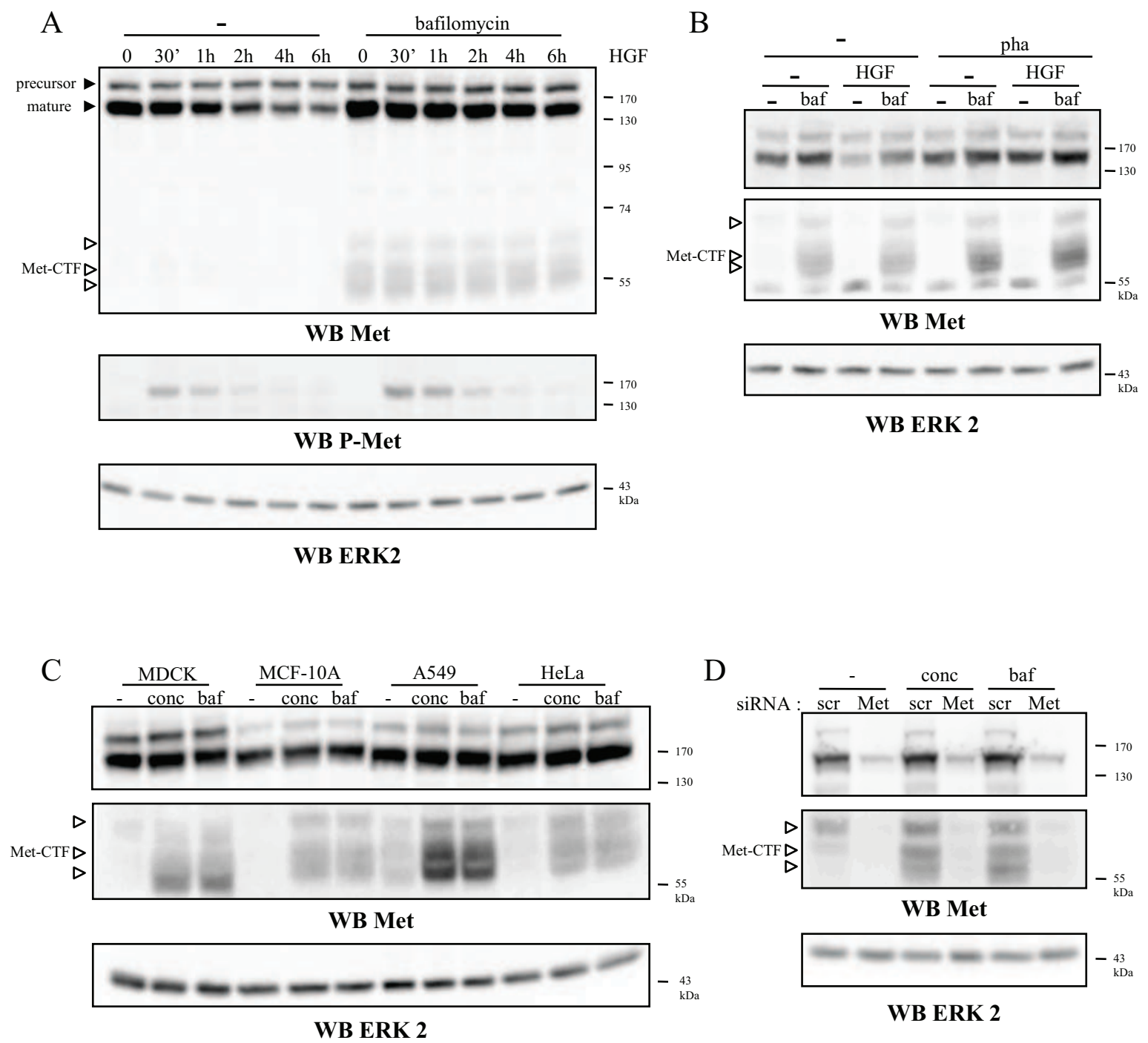
Figure 7: Expression of Full length Met and C-terminal fragments in tumor xenograft in mouse

Human transformed cell NCI-H69 and MDA-MB231 were inoculated subcutaneously into the posterior flank of immunodeficient *nu / nu* female mice. After 4 weeks, tumors were excised and lysed. For each sample, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies directed against the C-terminal end of human Met. Arrows indicate the positions of the Met C-terminal fragments (Met-CTF).

Figure 8: Focus formation assay in NIH3T3 cells expressing a Met C-terminal fragment.

(A) Schematic representation of TPR-Met, comprising the dimerization domain TPR (hatched) fused to the C-terminal region of Met (blank) and of Met-CTF, consisting of the Met signal peptide (gray) fused to the Met transmembrane and intracellular regions (blank). (B) Non-transfected NIH-3T3 cells (nt) or NIH-3T3 cells transfected with the empty, Met-CTF, or TPR-Met expression vector, were cultured for 1 day in DMEM-10% FCS. Cells of each treatment group were split into 100-mm dishes for subsequent culturing and the remaining cells were lysed. Whole-cell extracts were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies directed against ERK2, the Met kinase domain, and the phosphorylated residues of this kinase domain. (B) The subcultures obtained upon splitting were grown for 2 weeks, stained with Carazzi blue, and the foci were counted (n=3). Representative stained dishes are shown.

Figure 1



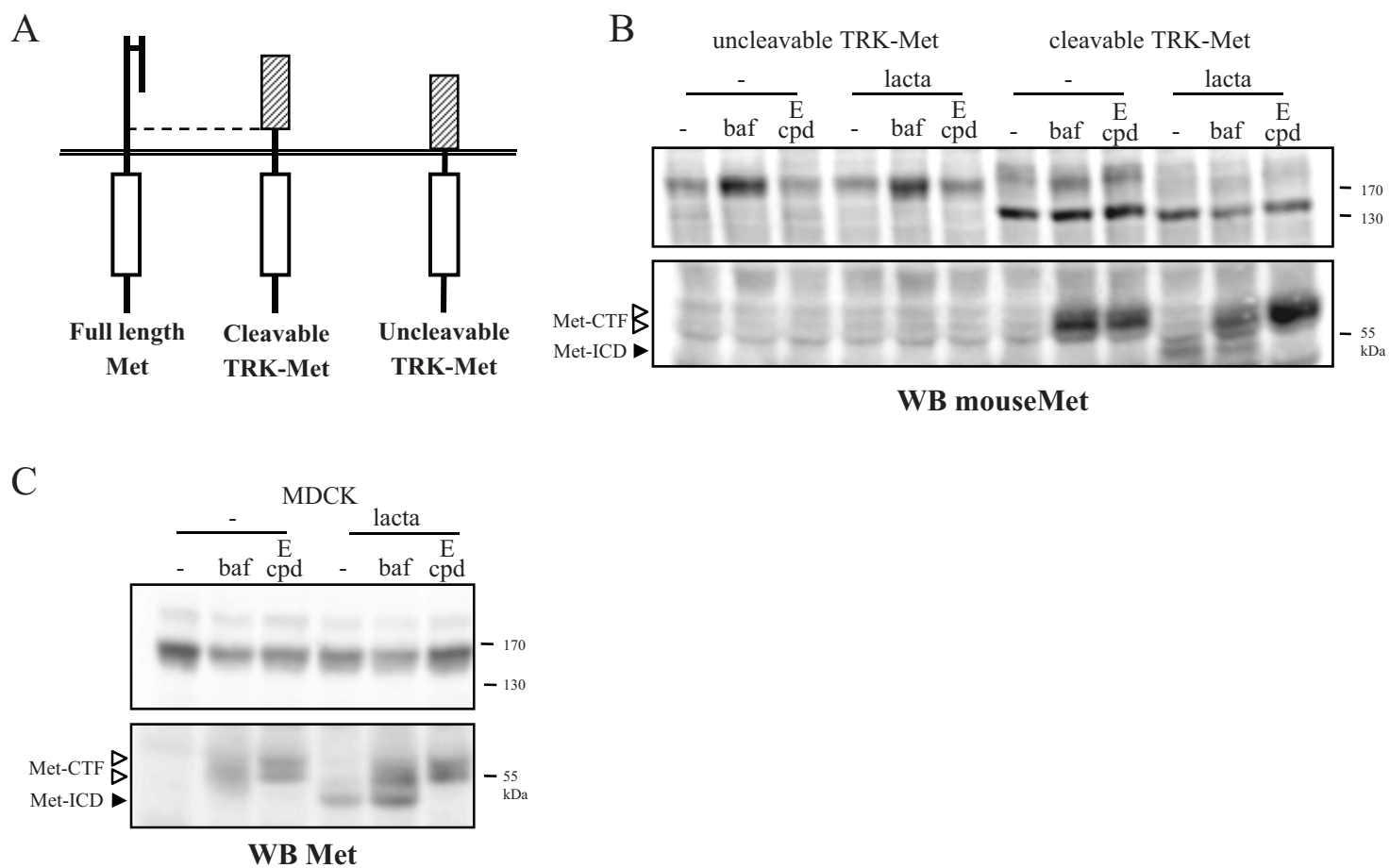


Figure 2

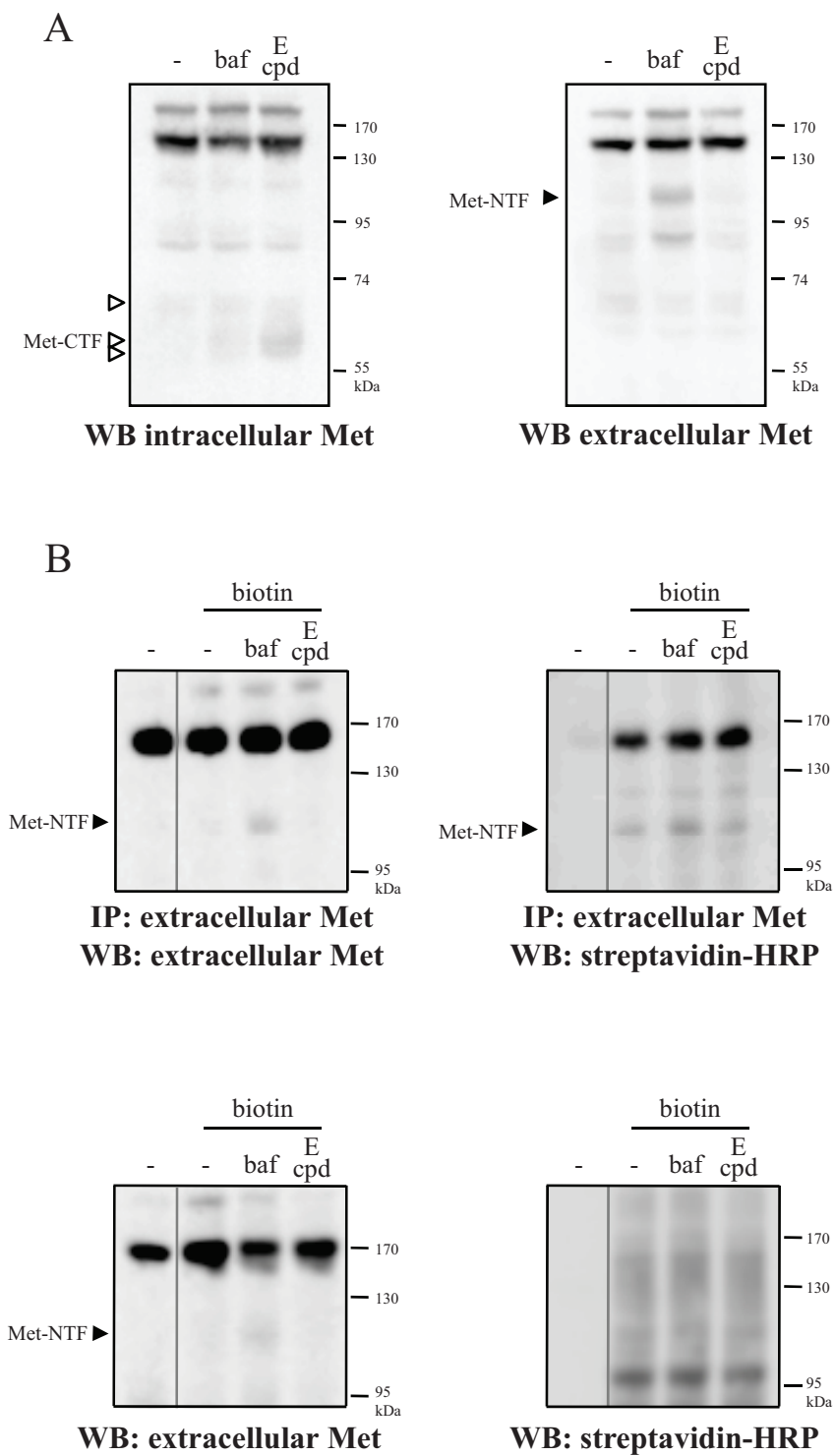


Figure 3

Figure 4

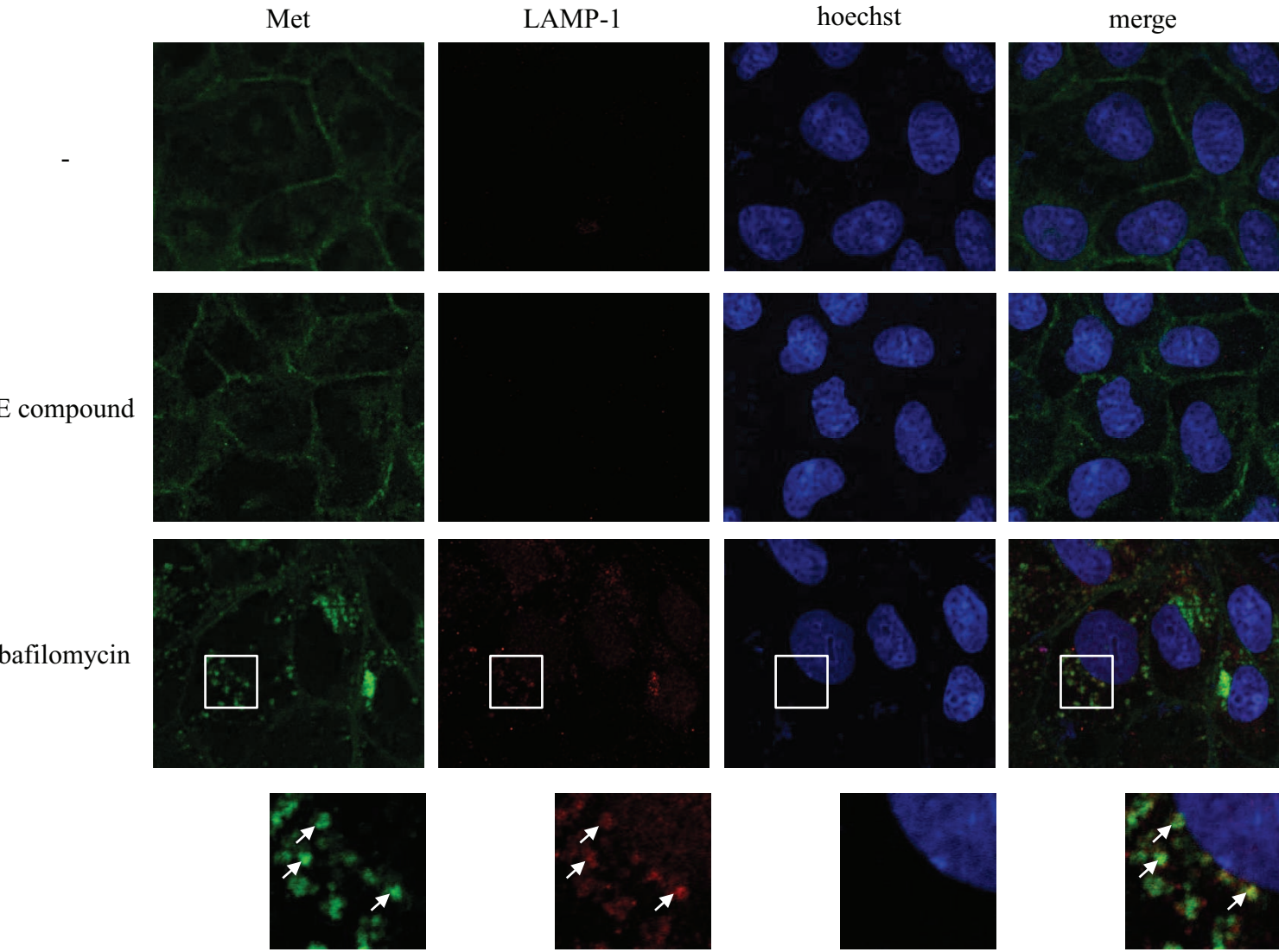


Figure 5

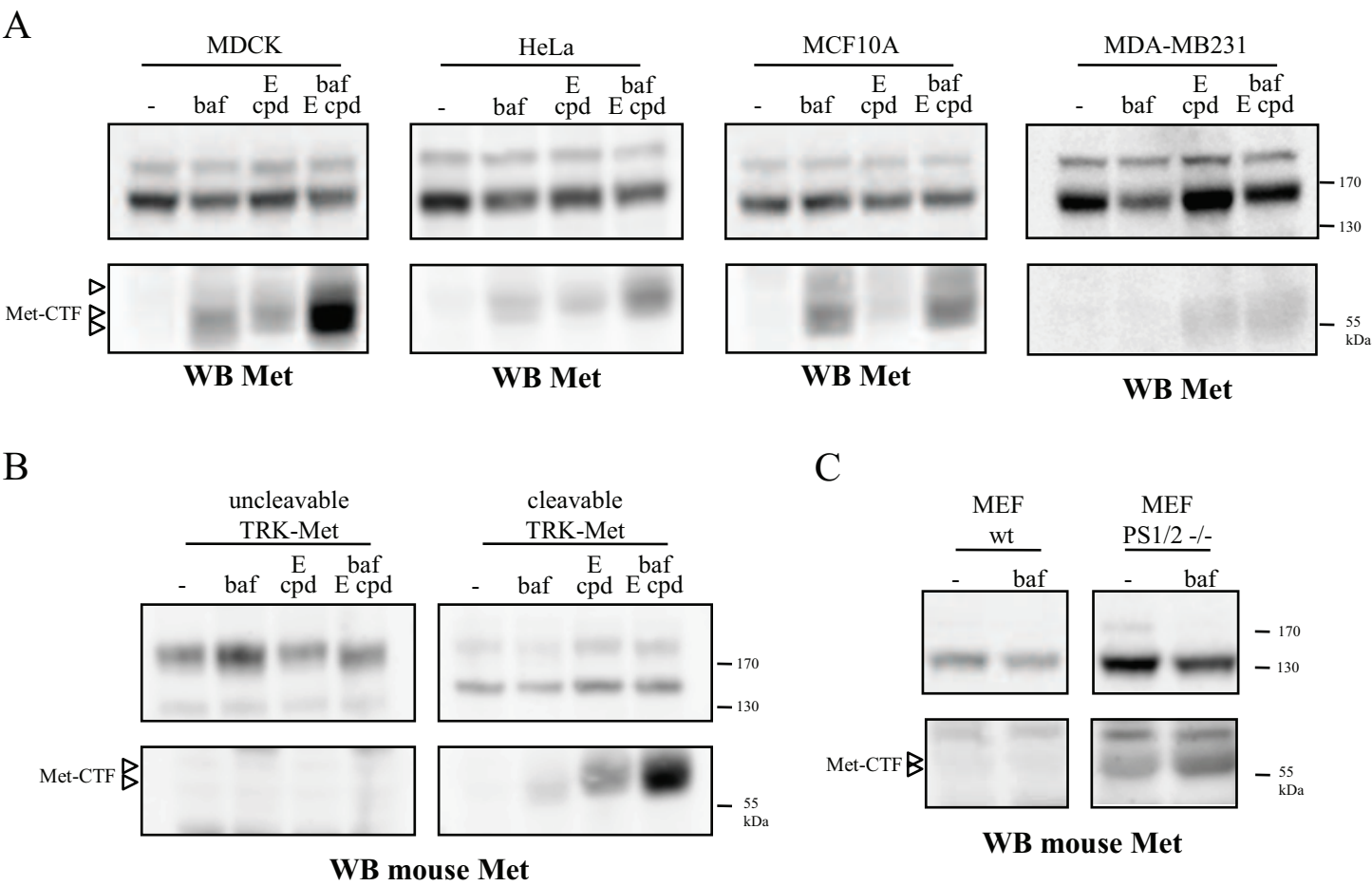


Figure 6

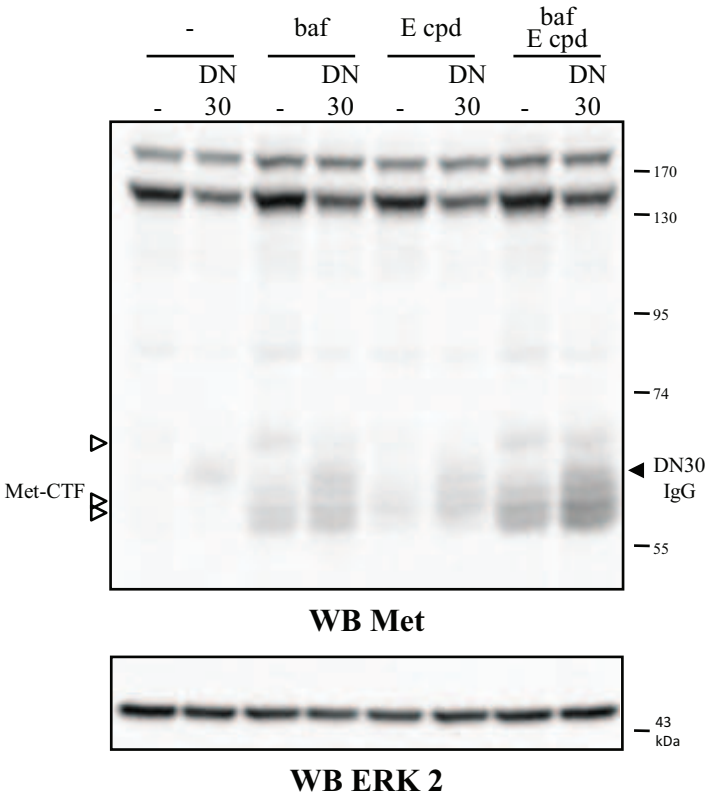


Figure 7

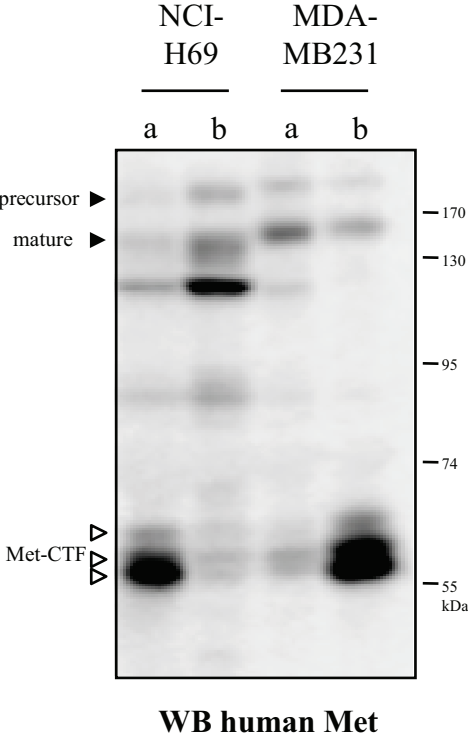
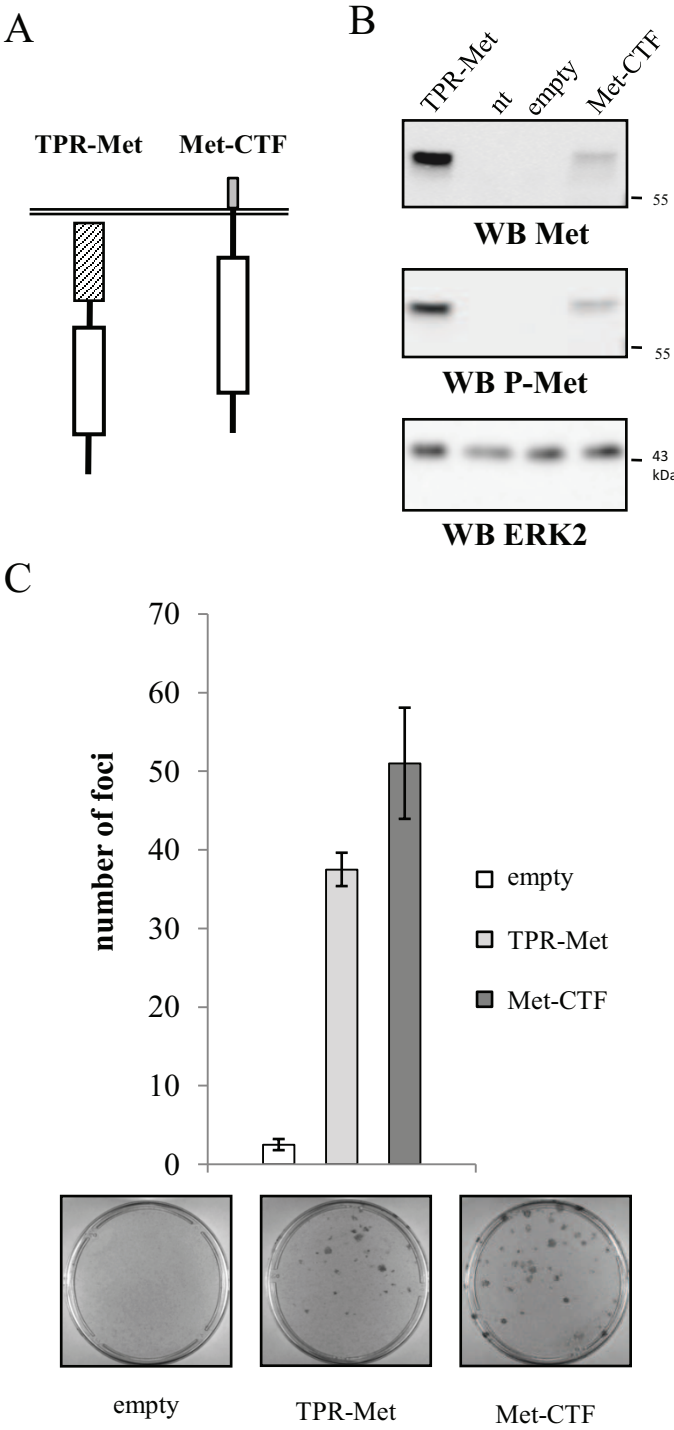


Figure 8



C- Résultats complémentaires sur la protéase responsable de l'élitage

Notre laboratoire a mis en évidence que l'ADAM17 participait à l'élitage de Met lors du PS-RIP (Foveau et al., 2009). Cependant, ce résultat n'a été obtenu que dans des MCF-10A, des cellules épithéliales mammaires immortalisées. Quant à la métalloprotéase impliquée dans la voie de dégradation lysosomale, elle n'a pas été identifiée. De plus, il a été montré que l'ADAM10, et non l'ADAM17, est capable d'élaguer le récepteur dans certaines conditions. En effet, l'ADAM10 contribue à l'élitage de Met lors de l'infection d'une cellule par une bactérie, *helicobacter pylori* (Schirrmeister et al., 2009). Cette même ADAM est nécessaire à la dégradation de Met induite par l'anticorps DN30 (Schelter et al.). Au moins deux ADAM contribuent donc à l'élitage de Met et leur implication semble varier selon le type cellulaire ou le stimulus induisant l'élitage. Nous avons donc cherché à identifier la ou les ADAM impliquées dans l'élitage de Met en élargissant nos investigations à l'ensemble de la famille.

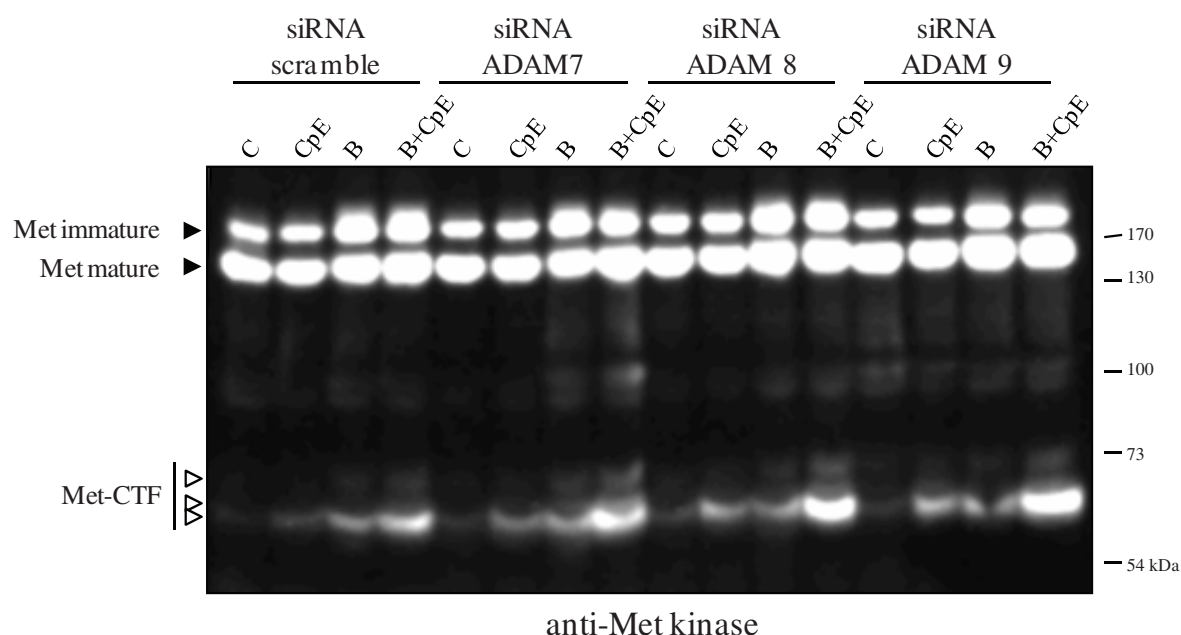


Figure 25: Action des siRNA dirigés contre les ADAM7, 8 et 9 sur Met dans les cellules A549

Les cellules ont été transfectées par des sets de siRNA contrôle (scramble) ou dirigés contre chaque ADAM. Les cellules ont ensuite été traitées 24h au composé E (CpE), un inhibiteur du complexe γ -secrétase et/ou à la bafilomycine (B) avant d'être lysées. Les extraits cellulaires ont été déposés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Les protéines ont été révélées par Western-Blot avec l'anticorps spécifié.

Pour cela, nous avons eu recours à une banque de siRNA. Chaque métalloprotéase testée a été la cible d'un set de 4 siRNA. L'utilisation d'un set permet de diminuer la concentration des siRNA et donc de diminuer le risque de dégradation non-spécifique d'autres ARNm, tout en évitant le risque d'utiliser un unique siRNA pouvant être inefficace. Les siRNA choisis ont été dirigés contre les 16 ADAM connues comme possédant un domaine enzymatique fonctionnel et contre BACE 1 et 2. En effet, les RTK sont généralement élagués par les ADAM. Quant à BACE 1 et 2, il s'agit de protéases également connues pour élaguer des récepteurs et notamment APP (Amyloid Precursor Protein).

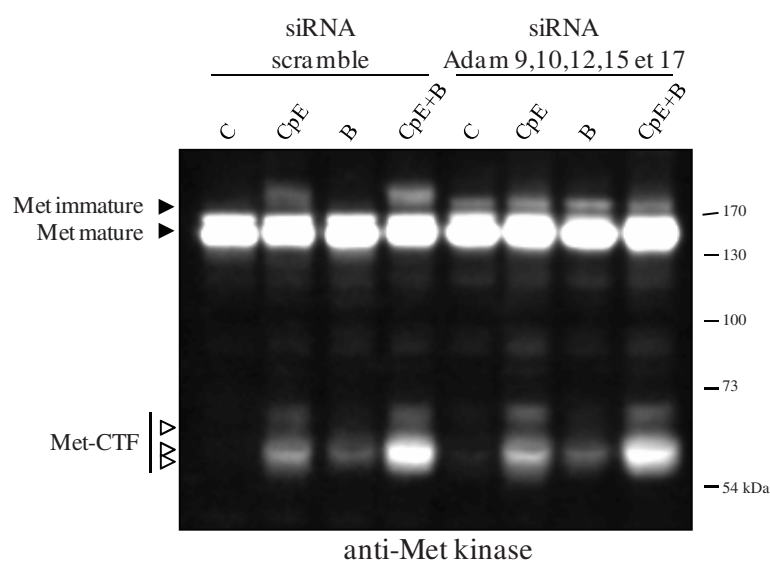


Figure 26: Utilisation simultanée des siRNA dirigés contre les ADAM 9, 10, 12, 15 et 17 sur Met dans les cellules A549

Les cellules ont été transfectées par des sets de siRNA contrôle (scramble) ou dirigés contre l'ensemble des ADAM 9, 10, 12, 15 et 17. Les cellules ont ensuite été traitées 24h au composé E (CpE), un inhibiteur du complexe γ -secrétase et/ou à la bafilomycine (B) avant d'être lysées. Les extraits cellulaires ont été déposés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Les protéines ont été révélées par Western-Blot avec l'anticorps spécifié.

Nous avons choisi d'effectuer ces expériences dans les cellules A549, des cellules d'adénocarcinome pulmonaires, dans lesquelles les fragments Met-CTF et lyso-Met-CTF sont efficacement stabilisés en présence d'inhibiteurs du lysosome et/ou du complexe γ -secrétase. Aucun siRNA n'a diminué l'accumulation des fragments Met-CTF dans les cellules A549 (voir Figure 25). L'utilisation simultanée des ADAM 9, 10, 12, 15 et 17, qui sont majoritairement impliquées dans l'élagage des récepteurs membranaires, n'a pas non plus diminué les quantités de fragments CTF-Met (voir Figure 26). Cette stratégie ne nous aura donc

pas permis d'identifier la ou les protéases responsables de l'élagage de Met. Pour valider cette expérience, nous devons nous assurer que chaque set de siRNA inhibe l'expression des protéases ciblées, une tâche rendue difficile par le nombre de protéases à tester. Il n'est donc pas exclu que les siRNA utilisés n'aient pas été efficaces. Une autre hypothèse est que Met soit élagué par un nombre important de protéases capables de se substituer, ce qui expliquerait que les inhibiteurs de métalloprotéases que nous avons testés soient si peu efficaces. Enfin, la ou les protéases responsables de l'élagage pourraient varier selon le contexte et le type cellulaire, comme nous le montrent les exemples de l'action de l'ADAM17 dans le PS-RIP ou de l'activation de ADAM10 induite par *helicobacter pylori* et par le DN30 (Schelter et al., ; Schirrmeister et al., 2009).

D- Discussion

Lors de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence deux mécanismes de dégradation du récepteur Met indépendants du ligand impliquant des clivages protéolytiques : la voie du PS-RIP et la voie lysosomale (voir Figure 27).

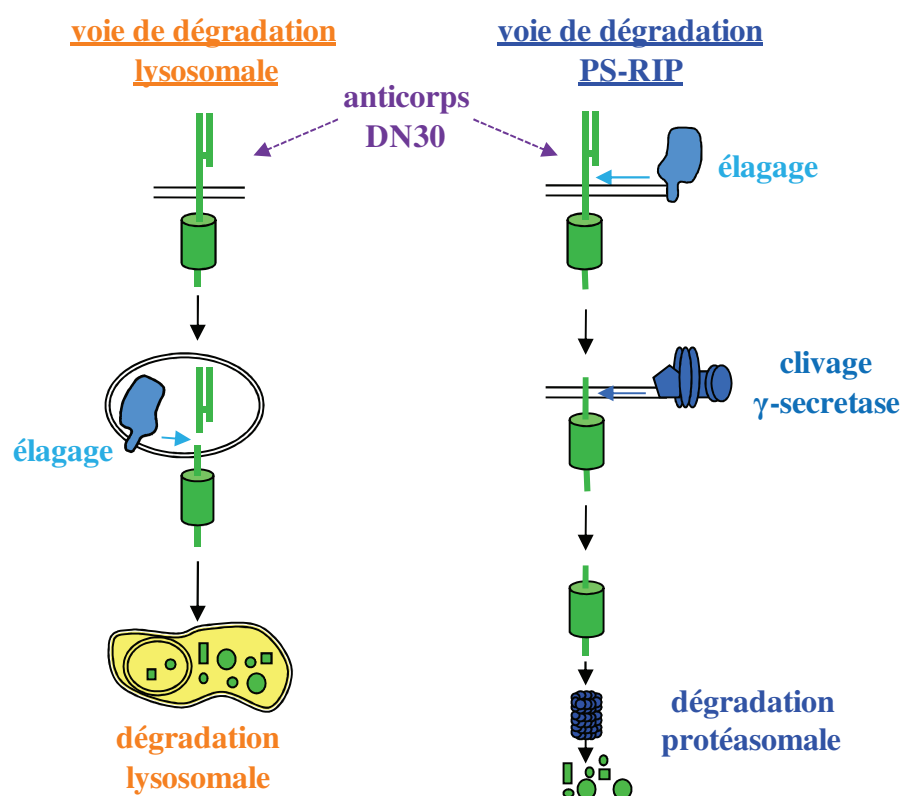


Figure 27: Schéma récapitulatif des voies de dégradation de Met en absence de ligand

1) Régulation de l'élitage de Met

Nous avons montré que le PS-RIP et la voie lysosomale permettent la dégradation constitutive du récepteur. Ces deux voies impliquent initialement l'élitage du récepteur, cependant les mécanismes permettant de réguler ce clivage sont inconnus.

Le domaine transmembranaire extracellulaire de Met étant indispensable à l'élitage des chimères Trk-Met, ce domaine pourrait posséder une séquence reconnue par une ou plusieurs métalloprotéases. Pour identifier plus précisément cette séquence, des récepteurs Met délétés des 25 ou 50 premiers aa de la partie extracellulaire ont été construits. Cependant, les deux délétions n'ont pas inhibé l'élitage. Les métalloprotéases ne reconnaîtraient donc pas une séquence particulière du récepteur mais elles agiraient sur la région transmembranaire de façon aspécifique. Il est également possible que cette région soit clivée différemment selon les métalloprotéases impliquées ce qui expliquerait notre difficulté à identifier spécifiquement le site de l'élitage de Met.

Même s'il semble que les métalloprotéases agissent de manière constitutive sur Met, il est envisageable que certains facteurs puissent moduler son élitage. Généralement, le principal inducteur de l'élitage des RTK est leur ligand, il a d'ailleurs été montré que l'HGF/SF permet l'élitage dans des cellules endothéliales (Wajih et al., 2002). Cependant, dans toutes les cellules épithéliales que nous avons testées, la stimulation par l'HGF/SF n'a pas permis de moduler ce clivage (Ancot et al., 2009; Foveau et al., 2009). L'induction de l'élitage de Met par son ligand pourrait donc être dépendante du type cellulaire. Un autre inducteur physiologique connu de l'élitage de Met est l'EGF. En effet, l'activation de l'EGFR par son ligand augmente le clivage de Met, vraisemblablement *via* la voie des MAPKinases (Nath et al., 2001). Cette voie possédant une activité minimale même en absence de ligand, il est possible que cela suffise à activer constitutivement les métalloprotéases et donc à élaguer Met. Pour vérifier cela, nous pourrions utiliser des inhibiteurs pharmacologiques ciblant la voie MAPKinase et en vérifier l'impact sur les clivages de Met.

Par ailleurs, la localisation du récepteur pourrait également avoir un impact sur l'élitage. Il a notamment été montré que les radeaux lipidiques, une région de la membrane plasmique riche en acides gras, sont un environnement qui influe sur l'élitage de différents récepteurs tels que p75NTR, l'interleukine-6, le collagène XIII et XXIII et Sonic Hedgehog (Dierker et al., 2009; Gil et al., 2007 ; Matthews et al., 2003; Vaisanen et al., 2006; von

Tresckow et al., 2004). Il pourrait alors être intéressant d'étudier la présence et l'élagage de Met dans ces radeaux lipidiques. Le récepteur pourrait y être protégé de l'élagage comme cela a été montré chez p75NTR (Gil et al., 2007), ou inversement y être favorisé comme c'est le cas pour le collagène XIII (Vaisanen et al., 2006).

2) Comparaison de la voie PS-RIP et de la voie lysosomale

Suite à l'élagage, le fragment C-terminal de Met (Met-CTF) est rapidement pris en charge par le complexe γ -secrétase avant d'être dégradé par le protéasome lors du PS-RIP. Cependant, nous avons montré que le récepteur peut échapper au PS-RIP en étant internalisé. Ce mécanisme d'internalisation qui ne dépend pas du ligand reste à identifier. Lors de son internalisation, Met est également élagué, mais le lyso-Met-CTF n'est pas clivé par le complexe γ -secrétase, il est aiguillé jusqu'à sa dégradation par le lysosome. Les fragments C-terminaux de Met suivent donc deux voies de dégradation différentes. Leur aiguillage distinct pourrait être la conséquence d'une modification post-traductionnelle particulière telle que l'ubiquitynilation. Il a ainsi été montré que le récepteur Notch suit deux voies différentes selon qu'il est mono- ou poly-ubiquitinylé. En absence de son ligand, Notch est internalisé sans subir de clivage, il est polyubiquitinylé dans l'endosome qui l'aiguille alors vers le lysosome. En présence de son ligand, Notch est élagué puis internalisé, il est monoubitinylé avant d'être pris en charge par le complexe γ -secrétase. Notch-ICD est un fragment labile dégradé par le protéasome, cependant il est également transloqué dans le noyau où il est capable de réguler la transcription (voir pour revue (Brou, 2009)). En présence d'HGF/SF, le récepteur Met est également connu pour être mono-ubiquitinylé ce qui lui permet d'être dirigé jusqu'au lysosome pour y être dégradé (Abella et al., 2005). Il serait intéressant de savoir si Met subit l'une ou l'autre ubiquitinylation lors de son adressage vers les voies PS-RIP ou lysosomales, ce qui pourrait expliquer son cheminement vers l'une ou l'autre des voies de dégradation. Des études sont d'ailleurs actuellement menées dans notre laboratoire dans cette optique.

Il est intéressant de noter que lors du processus de PS-RIP, le fragment Met-NTF est libéré dans le milieu extracellulaire. Or le Met-NTF garde la capacité d'interagir avec l'HGF/SF, comme cela a été montré pour des leurres de Met constitués de tout ou partie de la région extracellulaire (Michieli et al., 2004; Petrelli et al., 2006). Dans les cellules mettant en œuvre majoritairement la dégradation par le PS-RIP, la dégradation du récepteur et la création d'un fragment Met-NTF capable de leurrer l'HGF/SF seraient deux mécanismes

complémentaires permettant d'inactiver Met. Ce double mécanisme ne serait pas mis en place dans les cellules privilégiant la dégradation par la voie lysosomale

Les fragments intracellulaires de Met pourraient également avoir des fonctions biologiques dans la cellule. En effet, le processus de PS-RIP est connu pour générer des fragments ICD capable de se transloquer dans le noyau afin de transactiver des gènes cibles (Ancot et al., 2009). Ainsi nous avons observé que le fragment Met-ICD peut avoir une localisation nucléaire qui est compatible un potentiel rôle de facteur de transcription. Quant aux fragments Met-CTF, ils pourraient induire des voies de signalisation depuis la membrane plasmique et les compartiments intracellulaires à condition que leur domaine kinase soit activé. Les différents fragments de Met ont donc des caractéristiques intéressantes qui pourraient induire des fonctions différentes de celles du récepteur pleine longueur.

3) Les fragments de Met et le cancer

Les fragments Met-CTF et Met-ICD ne sont détectés dans les cultures cellulaires que si les voies de dégradation sont inhibées. Cette constatation cantonne donc les fragments à des rôles d'intermédiaires de dégradation. Cependant, suite à l'injection de cellules tumorales dans des flancs de souris, des fragments Met-CTF sont générés dans les tumeurs formées alors qu'aucun traitement permettant leur stabilisation n'a été utilisé. Dans certaines tumeurs, la quantité de Met-CTF est même largement supérieure à la quantité de récepteurs membranaire. L'accumulation de fragments Met-CTF suggère que l'élitage de Met est fortement favorisé en condition tumorale, ce qui confirme de précédents résultats mettant en évidence la présence de Met-NTF dans le plasma de souris ayant été greffées par des cellules tumorales humaines (Athauda et al., 2006). Ces observations sont cohérentes avec la richesse du stroma tumoral en métalloprotéases (Kessenbrock et al.). L'augmentation de l'activité de ces métalloprotéases peut être également due à l'action d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS, des molécules issues du métabolisme de l'oxygène, sont des messagers secondaires. En quantité trop importante, ils induisent des dommages oxydatifs pouvant altérer l'ADN et la structure de la cellule. Ils sont connus pour s'accumuler en conditions tumorales. Or il a été proposé que les ROS permettent d'induire l'élitage des récepteurs membranaires (Bass and Edwards, ; Willems et al.). Ainsi, la présence importante de ces ROS et de métalloprotéases dans le stroma pourrait favoriser l'élitage de Met. Par conséquent, le système de dégradation pourrait être saturé et permettre l'accumulation de fragments dans les cellules tumorales.

L'enjeu est maintenant de savoir si ces fragments de Met amplifient la tumorigenèse ou s'il ne s'agit que de produits de dégradation inactifs. Afin de répondre à cette question, il serait notamment possible d'étudier la génération de fragments de Met dans des tumeurs de patients. Cependant, l'expression de Met dans des tumeurs de patients exprimant Met est majoritairement détectée par immunohistochimie et cette technique ne permet pas de distinguer les fragments des récepteurs pleine longueur. Il serait nécessaire d'utiliser des extraits cellulaires issus de tumeurs et de les tester en Western-Blot. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite une grande quantité de matériel biologique.

Nous avons également montré que les fragments Met-CTF sont capables de transformer des fibroblastes dans des cultures cellulaires. De plus, il est connu que des fragments de certains récepteurs comme ErbB2-CTF et p75^{NTR}-ICD sont tumorigènes (Pedersen et al., 2009; Wang et al., 2008). Les fragments Met sont donc de potentiels facteurs transformants. Pour conforter cette hypothèse, il serait intéressant de moduler l'élavage et d'en évaluer les conséquences sur la tumorigenèse. Ainsi, nous pourrions comparer les capacités transformantes de cellules exprimant un récepteur clivable ou non par les métalloprotéases.

Il existe un nombre croissant d'outils thérapeutiques en essais cliniques visant à inhiber l'action tumorale du récepteur Met. En faisant l'hypothèse que les fragments de Met soient impliqués dans la progression tumorale, certains de ces outils ne pourraient pas fonctionner. En effet, les anticorps bloquants inhibent l'activation du récepteur pleine longueur en empêchant l'interaction entre la partie extracellulaire de Met et l'HGF/SF, ils ne pourraient donc pas agir sur des fragments oncogéniques intracellulaires. De même, les molécules analogues de l'ATP, qui inhibent l'activation du domaine kinase, ne seraient pas efficace si le Met-ICD agit en tant que facteur de transcription. Ces exemples soulignent l'enjeu de nos travaux puisque cette vision très fondamentale de la signalisation du récepteur Met pourrait avoir des implications importantes sur des aspects beaucoup plus appliqués.

CONCLUSION

Les clivages ou comment réguler des fonctions de Met en absence de ligand

Les fonctions des RTK sont depuis longtemps associées à la présence de leur ligand. En leur absence, les RTK étaient considérés comme inactifs et leurs fragments étaient considérés comme des intermédiaires de dégradation. Depuis, il a été découvert que des fragments de RTK ont des fonctions particulières dans la signalisation. Ainsi, en absence de leur ligand, les RTK de la famille des récepteurs à dépendance peuvent être clivés par des caspases et les fragments générés sont capables d'induire la mort cellulaire. De plus, des domaines ICD, issus du PS-RIP de RTK, peuvent agir en tant que facteur de transcription.

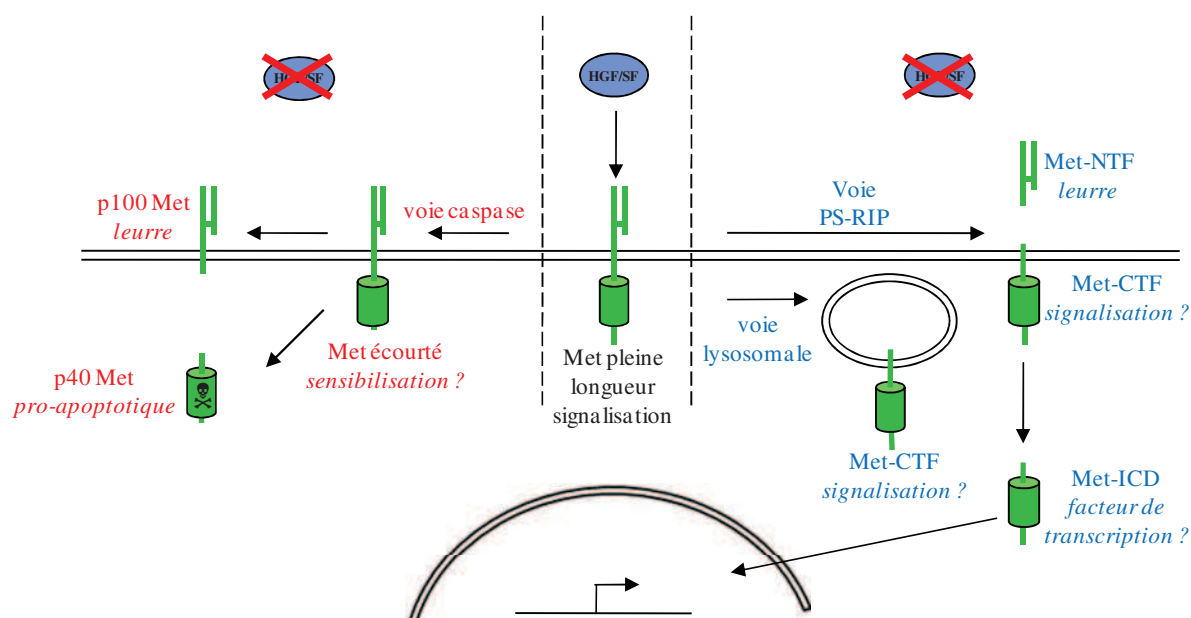


Figure 28: Schéma récapitulatif des fonctions des fragments de Met

Les études menées dans notre équipe sur les fragments de Met ont débuté par l'étude du fragment pro-apoptotique p40 Met généré par les clivages caspase. Dans ce contexte, j'ai étudié le rôle du clivage C-terminal de Met par les caspases. Le récepteur écourté permet toujours les réponses au ligand et favorise la génération de p40 Met, le clivage C-terminal accentuerait donc les caractéristiques de récepteur à dépendance de Met. Par la suite, notre expérience sur les clivages nous a logiquement amenés à l'étude des clivages constitutifs de Met. Nous avons alors mis en évidence deux voies de dégradation suite à l'élagage de Met : la voie PS-RIP et la voie lysosomale. Les fragments Met-CTF identifiés dans ces voies sont des intermédiaires de dégradation potentiellement transformants qui s'accumulent fortement dans des xénogreffes de cellules tumorales humaines chez la souris.

La dégradation du récepteur par les voies PS-RIP et lysosomale pourraient donc être un mécanisme empêchant l'accumulation de fragments délétères. Cependant, ces fragments pourraient également avoir une activité physiologique, notamment le Met-ICD qui pourrait être un facteur de transcription (voir Figure 28).

Les travaux effectués au laboratoire, notamment durant ma thèse, ont permis de décortiquer les mécanismes de clivages du récepteur Met. Nous avons également observé que les fragments générés durant ces processus ont des capacités autres que d'inactiver le récepteur Met. Il est maintenant intéressant d'approfondir les rôles de ces fragments de Met dans des conditions physiologiques ou pathologiques. Pour l'étude des clivages caspases, nous collaborons avec la clinique de la souris pour obtenir des souris KI où Met n'est pas clivé par les caspases. L'étude de ces souris permettrait de savoir si la perte des clivages caspase de Met induit un phénotype particulier. Quant aux fragments issus du PS-RIP ou de la voie lysosomale, il a été démontré leur accumulation dans les xénogreffes de tumeurs humaines chez la souris. Pour autant, il reste à faire un lien entre la tumorigénèse et les fragments du récepteur. Dans ce but, notre équipe travaille actuellement sur des lignées tumorales où Met est muté et pourrait générer des fragments tumorigènes. Une collaboration a également débuté pour identifier les mutations et les fragments de Met dans des tumeurs de patients.

BIBLIOGRAPHIE

Abella, J. V. and Park, M. (2009). Breakdown of endocytosis in the oncogenic activation of receptor tyrosine kinases. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E973-84.

Abella, J. V., Peschard, P., Naujokas, M. A., Lin, T., Saucier, C., Urbe, S. and Park, M. (2005). Met/Hepatocyte growth factor receptor ubiquitination suppresses transformation and is required for Hrs phosphorylation. *Mol Cell Biol* 25, 9632-45.

Abounader, R. and Lattera, J. (2005). Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumor growth and angiogenesis. *Neuro Oncol* 7, 436-51.

Aebersold, D. M., Landt, O., Berthou, S., Gruber, G., Beer, K. T., Greiner, R. H. and Zimmer, Y. (2003). Prevalence and clinical impact of Met Y1253D-activating point mutation in radiotherapy-treated squamous cell cancer of the oropharynx. *Oncogene* 22, 8519-23.

Akiyama, T., Matsuda, S., Namba, Y., Saito, T., Toyoshima, K. and Yamamoto, T. (1991). The transforming potential of the c-erbB-2 protein is regulated by its autophosphorylation at the carboxyl-terminal domain. *Mol Cell Biol* 11, 833-42.

Ancot, F., Foveau, B., Lefebvre, J., Leroy, C. and Tulasne, D. (2009). Proteolytic cleavages give receptor tyrosine kinases the gift of ubiquity. *Oncogene* 28, 2185-95.

Andermarcher, E., Surani, M. A. and Gherardi, E. (1996). Co-expression of the HGF/SF and c-met genes during early mouse embryogenesis precedes reciprocal expression in adjacent tissues during organogenesis. *Dev Genet* 18, 254-66.

Arrieta, O., Garcia, E., Guevara, P., Garcia-Navarrete, R., Ondarza, R., Rembao, D. and Sotelo, J. (2002). Hepatocyte growth factor is associated with poor prognosis of malignant gliomas and is a predictor for recurrence of meningioma. *Cancer* 94, 3210-8.

Asaoka, Y., Tada, M., Ikenoue, T., Seto, M., Imai, M., Miyabayashi, K., Yamamoto, K., Yamamoto, S., Kudo, Y., Mohri, D. Gastric cancer cell line Hs746T harbors a splice site mutation of c-Met causing juxtamembrane domain deletion. *Biochem Biophys Res Commun* 394, 1042-6.

Athauda, G., Giubellino, A., Coleman, J. A., Horak, C., Steeg, P. S., Lee, M. J., Trepel, J., Wimberly, J., Sun, J., Coxon, A. (2006). c-Met ectodomain shedding rate correlates with malignant potential. *Clin Cancer Res* 12, 4154-62.

Bachleitner-Hofmann, T., Sun, M. Y., Chen, C. T., Tang, L., Song, L., Zeng, Z., Shah, M., Christensen, J. G., Rosen, N., Solit, D. B. (2008). HER kinase activation confers resistance to MET tyrosine kinase inhibition in MET oncogene-addicted gastric cancer cells. *Mol Cancer Ther* 7, 3499-508.

Bagai, R., Fan, W. and Ma, P. C. ARQ-197, an oral small-molecule inhibitor of c-Met for the treatment of solid tumors. *IDrugs* 13, 404-14.

Basilico, C., Arnesano, A., Galluzzo, M., Comoglio, P. M. and Michieli, P. (2008). A high affinity hepatocyte growth factor-binding site in the immunoglobulin-like region of Met. *J Biol Chem* 283, 21267-77.

Bass, R. and Edwards, D. R. ADAMs and protein disulfide isomerase: the key to regulated cell-surface protein ectodomain shedding? *Biochem J* 428, e3-5.

Benvenuti, S. and Comoglio, P. M. (2007). The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. *J Cell Physiol* 213, 316-25.

Bertotti, A., Burbridge, M. F., Gastaldi, S., Galimi, F., Torti, D., Medico, E., Giordano, S., Corso, S., Rolland-Valognes, G., Lockhart, B. P. et al. (2009). Only a subset of Met-activated pathways are required to sustain oncogene addiction. *Sci Signal* 2, ra80.

Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E. and Vande Woude, G. F. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 915-25.

Birchmeier, C. and Gherardi, E. (1998). Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* 8, 404-10.

Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A. and Birchmeier, C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376, 768-71.

Blobel, C. P. (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 32-43.

Boccaccio, C., Ando, M., Tamagnone, L., Bardelli, A., Michieli, P., Battistini, C. and Comoglio, P. M. (1998). Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* 391, 285-8.

Bordeaux, M. C., Forcet, C., Granger, L., Corset, V., Bidaud, C., Billaud, M., Bredesen, D. E., Edery, P. and Mehlen, P. (2000). The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *Embo J* 19, 4056-63.

Borowiak, M., Garratt, A. N., Wustefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C. and Birchmeier, C. (2004). Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10608-13.

Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Faletto, D. L., Chan, A. M., Kmiecik, T. E., Vande Woude, G. F. and Aaronson, S. A. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251, 802-4.

Brou, C. (2009). Intracellular trafficking of Notch receptors and ligands. *Exp Cell Res* 315, 1549-55.

Bussolino, F., Di Renzo, M. F., Ziche, M., Bocchietto, E., Olivero, M., Naldini, L., Gaudino, G., Tamagnone, L., Coffey, A. and Comoglio, P. M. (1992). Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 119, 629-41.

Chan, A., Rubin, J., Bottaro, D., Hirschfield, D., Chedid, M. and Aaronson, S. A. (1993). Isoforms of human HGF and their biological activities. *Exs* 65, 67-79.

Chen, S. Y. and Chen, H. C. (2006). Direct interaction of focal adhesion kinase (FAK) with Met is required for FAK to promote hepatocyte growth factor-induced cell invasion. *Mol Cell Biol* 26, 5155-67.

Chiara, F., Bishayee, S., Heldin, C. H. and Demoulin, J. B. (2004). Autoinhibition of the platelet-derived growth factor beta-receptor tyrosine kinase by its C-terminal tail. *J Biol Chem* 279, 19732-8.

Chiara, F., Michieli, P., Pugliese, L. and Comoglio, P. M. (2003). Mutations in the met oncogene unveil a "dual switch" mechanism controlling tyrosine kinase activity. *J Biol Chem* 278, 29352-8.

Chmielowiec, J., Borowiak, M., Morkel, M., Stradal, T., Munz, B., Werner, S., Wehland, J., Birchmeier, C. and Birchmeier, W. (2007). c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol* 177, 151-62.

Christensen, J. G., Schreck, R., Burrows, J., Kuruganti, P., Chan, E., Le, P., Chen, J., Wang, X., Ruslim, L., Blake, R. (2003). A selective small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met-dependent phenotypes in vitro and exhibits cytoreductive antitumor activity in vivo. *Cancer Res* 63, 7345-55.

Colombo, E. S., Menicucci, G., McGuire, P. G. and Das, A. (2007). Hepatocyte growth factor/scatter factor promotes retinal angiogenesis through increased urokinase expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 1793-800.

Conrotto, P., Corso, S., Gamberini, S., Comoglio, P. M. and Giordano, S. (2004). Interplay between scatter factor receptors and B plexins controls invasive growth. *Oncogene* 23, 5131-7.

Cooper, C. S., Blair, D. G., Oskarsson, M. K., Tainsky, M. A., Eader, L. A. and Vande Woude, G. F. (1984). Characterization of human transforming genes from chemically transformed, teratocarcinoma, and pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 44, 1-10.

Cristiani, C., Rusconi, L., Perego, R., Schiering, N., Kalisz, H. M., Knapp, S. and Isacchi, A. (2005). Regulation of the wild-type and Y1235D mutant Met kinase activation. *Biochemistry* 44, 14110-9.

Deheuninck, J., Foveau, B., Goormachtigh, G., Leroy, C., Ji, Z., Tulasne, D. and Fafeur, V. (2008). Caspase cleavage of the MET receptor generates an HGF interfering fragment. *Biochem Biophys Res Commun* 367, 573-7.

Deheuninck, J., Goormachtigh, G., Foveau, B., Ji, Z., Leroy, C., Ancot, F., Villeret, V., Tulasne, D. and Fafeur, V. (2009). Phosphorylation of the MET receptor on juxtamembrane tyrosine residue 1001 inhibits its caspase-dependent cleavage. *Cell Signal* 21, 1455-63.

Dierker, T., Dreier, R., Petersen, A., Bordych, C. and Grobe, K. (2009). Heparan sulfate-modulated, metalloprotease-mediated sonic hedgehog release from producing cells. *J Biol Chem* 284, 8013-22.

Ederly, P., Lyonnet, S., Mulligan, L. M., Pelet, A., Dow, E., Abel, L., Holder, S., Nihoul-Fekete, C., Ponder, B. A. and Munnich, A. (1994). Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367, 378-80.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J. O., Lindeman, N., Gale, C. M., Zhao, X., Christensen, J. et al. (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316, 1039-43.

Ferracini, R., Di Renzo, M. F., Scotlandi, K., Baldini, N., Olivero, M., Lollini, P., Cremona, O., Campanacci, M. and Comoglio, P. M. (1995). The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. *Oncogene* 10, 739-49.

Ferracini, R., Longati, P., Naldini, L., Vigna, E. and Comoglio, P. M. (1991). Identification of the major autophosphorylation site of the Met/hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 266, 19558-64.

Ferracini, R., Olivero, M., Di Renzo, M. F., Martano, M., De Giovanni, C., Nanni, P., Basso, G., Scotlandi, K., Lollini, P. L. and Comoglio, P. M. (1996). Retrogenic

expression of the MET proto-oncogene correlates with the invasive phenotype of human rhabdomyosarcomas. *Oncogene* 12, 1697-705.

Finegold, D. N., Schacht, V., Kimak, M. A., Lawrence, E. C., Foeldi, E., Karlsson, J. M., Baty, C. J. and Ferrell, R. E. (2008). HGF and MET mutations in primary and secondary lymphedema. *Lymphat Res Biol* 6, 65-8.

Foveau, B., Ancot, F., Leroy, C., Petrelli, A., Reiss, K., Vingtdoux, V., Giordano, S., Fafeur, V. and Tulasne, D. (2009). Down-regulation of the met receptor tyrosine kinase by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis. *Mol Biol Cell* 20, 2495-507.

Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C. and Gonzalez-Baron, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 30, 193-204.

Fukuda, T., Ichimura, E., Shinozaki, T., Sano, T., Kashiwabara, K., Oyama, T., Nakajima, T. and Nakamura, T. (1998). Coexpression of HGF and c-Met/HGF receptor in human bone and soft tissue tumors. *Pathol Int* 48, 757-62.

Furge, K. A., Zhang, Y. W. and Vande Woude, G. F. (2000). Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 19, 5582-9.

Furne, C., Rama, N., Corset, V., Chedotal, A. and Mehlen, P. (2008). Netrin-1 is a survival factor during commissural neuron navigation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14465-70.

Gallego, M. I., Bierie, B. and Hennighausen, L. (2003). Targeted expression of HGF/SF in mouse mammary epithelium leads to metastatic adenosquamous carcinomas through the activation of multiple signal transduction pathways. *Oncogene* 22, 8498-508.

Galvani, A. P., Cristiani, C., Carpinelli, P., Landonio, A. and Bertolero, F. (1995). Suramin modulates cellular levels of hepatocyte growth factor receptor by inducing shedding of a soluble form. *Biochem Pharmacol* 50, 959-66.

Gambarotta, G., Boccaccio, C., Giordano, S., Ando, M., Stella, M. C. and Comoglio, P. M. (1996). Ets up-regulates MET transcription. *Oncogene* 13, 1911-7.

Garcia, S., Dales, J. P., Charafe-Jauffret, E., Carpentier-Meunier, S., Andrac-Meyer, L., Jacquemier, J., Andonian, C., Lavaut, M. N., Allasia, C., Bonnier, P. (2007). Poor prognosis in breast carcinomas correlates with increased expression of targetable CD146 and c-Met and with proteomic basal-like phenotype. *Hum Pathol* 38, 830-41.

Gherardi, E., Love, C. A., Esnouf, R. M. and Jones, E. Y. (2004). The sema domain. *Curr Opin Struct Biol* 14, 669-78.

Gherardi, E., Sandin, S., Petoukhov, M. V., Finch, J., Youles, M. E., Ofverstedt, L. G., Miguel, R. N., Blundell, T. L., Vande Woude, G. F., Skoglund, U. (2006). Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4046-51.

Ghoussoub, R. A., Dillon, D. A., D'Aquila, T., Rimm, E. B., Fearon, E. R. and Rimm, D. L. (1998). Expression of c-met is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma. *Cancer* 82, 1513-20.

Gil, C., Cubi, R. and Aguilera, J. (2007). Shedding of the p75NTR neurotrophin receptor is modulated by lipid rafts. *FEBS Lett* 581, 1851-8.

Giordano, S., Corso, S., Conrotto, P., Artigiani, S., Gilestro, G., Barberis, D., Tamagnone, L. and Comoglio, P. M. (2002). The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat Cell Biol* 4, 720-4.

Giordano, S., Di Renzo, M. F., Narsimhan, R. P., Cooper, C. S., Rosa, C. and Comoglio, P. M. (1989). Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene. *Oncogene* 4, 1383-8.

Goldoni, S., Humphries, A., Nystrom, A., Sattar, S., Owens, R. T., McQuillan, D. J., Ireton, K. and Iozzo, R. V. (2009). Decorin is a novel antagonistic ligand of the Met receptor. *J Cell Biol* 185, 743-54.

Goldschneider, D. and Mehlen, P. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* 29, 1865-82.

Gordon, M. S., Sweeney, C. S., Mendelson, D. S., Eckhardt, S. G., Anderson, A., Beaupre, D. M., Branstetter, D., Burgess, T. L., Coxon, A., Deng, H. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of AMG 102, a fully human hepatocyte growth factor-neutralizing monoclonal antibody, in a first-in-human study of patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 16, 699-710.

Graveel, C., Su, Y., Koeman, J., Wang, L. M., Tessarollo, L., Fiscella, M., Birchmeier, C., Swiatek, P., Bronson, R. and Vande Woude, G. (2004). Activating Met mutations produce unique tumor profiles in mice with selective duplication of the mutant allele. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17198-203.

Gual, P., Giordano, S., Williams, T. A., Rocchi, S., Van Obberghen, E. and Comoglio, P. M. (2000). Sustained recruitment of phospholipase C-gamma to Gab1 is required for HGF-induced branching tubulogenesis. *Oncogene* 19, 1509-18.

Guo, A., Villen, J., Kornhauser, J., Lee, K. A., Stokes, M. P., Rikova, K., Possemato, A., Nardone, J., Innocenti, G., Wetzel, R. (2008). Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 692-7.

Hammond, D. E., Urbe, S., Vande Woude, G. F. and Clague, M. J. (2001). Down-regulation of MET, the receptor for hepatocyte growth factor. *Oncogene* 20, 2761-70.

Herrick, J., Michalet, X., Conti, C., Schurra, C. and Bensimon, A. (2000). Quantifying single gene copy number by measuring fluorescent probe lengths on combed genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 222-7.

Hiscox, S. and Jiang, W. G. (1999). Association of the HGF/SF receptor, c-met, with the cell-surface adhesion molecule, E-cadherin, and catenins in human tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 261, 406-11.

Holmes, O., Pillozzi, S., Deakin, J. A., Carafoli, F., Kemp, L., Butler, P. J., Lyon, M. and Gherardi, E. (2007). Insights into the structure/function of hepatocyte growth factor/scatter factor from studies with individual domains. *J Mol Biol* 367, 395-408.

Huh, C. G., Factor, V. M., Sanchez, A., Uchida, K., Conner, E. A. and Thorgeirsson, S. S. (2004). Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4477-82.

Ide, T., Kitajima, Y., Miyoshi, A., Ohtsuka, T., Mitsuno, M., Ohtaka, K., Koga, Y. and Miyazaki, K. (2006). Tumor-stromal cell interaction under hypoxia increases the invasiveness of pancreatic cancer cells through the hepatocyte growth factor/c-Met pathway. *Int J Cancer* 119, 2750-9.

Ishibe, S., Karihaloo, A., Ma, H., Zhang, J., Marlier, A., Mitobe, M., Togawa, A., Schmitt, R., Czyczk, J., Kashgarian, M. (2009). Met and the epidermal growth factor receptor act cooperatively to regulate final nephron number and maintain collecting duct morphology. *Development* 136, 337-45.

Ivan, M., Bond, J. A., Prat, M., Comoglio, P. M. and Wynford-Thomas, D. (1997). Activated ras and ret oncogenes induce over-expression of c-met (hepatocyte growth factor receptor) in human thyroid epithelial cells. *Oncogene* 14, 2417-23.

Jagadeeswaran, R., Ma, P. C., Seiwert, T. Y., Jagadeeswaran, S., Zumba, O., Nallasura, V., Ahmed, S., Filiberti, R., Paganuzzi, M., Puntoni, R. (2006). Functional analysis of c-Met/hepatocyte growth factor pathway in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res* 66, 352-61.

Jeffers, M., Fiscella, M., Webb, C. P., Anver, M., Koochekpour, S. and Vande Woude, G. F. (1998). The mutationally activated Met receptor mediates motility and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14417-22.

Jeffers, M., Schmidt, L., Nakaigawa, N., Webb, C. P., Weirich, G., Kishida, T., Zbar, B. and Vande Woude, G. F. (1997). Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11445-50.

Jeffers, M. F. (1999). Activating mutations in the Met receptor overcome the requirement for autophosphorylation of tyrosines crucial for wild type signaling. *Oncogene* 18, 5120-5.

Jiang, W., Hiscox, S., Matsumoto, K. and Nakamura, T. (1999). Hepatocyte growth factor/scatter factor, its molecular, cellular and clinical implications in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 29, 209-48.

Jin, H., Yang, R., Li, W., Ogasawara, A. K., Schwall, R., Eberhard, D. A., Zheng, Z., Kahn, D. and Paoni, N. F. (2003). Early treatment with hepatocyte growth factor improves cardiac function in experimental heart failure induced by myocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther* 304, 654-60.

Jin, H., Yang, R., Zheng, Z., Romero, M., Ross, J., Bou-Reslan, H., Carano, R. A., Kasman, I., Mai, E., Young, J. (2008). MetMAb, the one-armed 5D5 anti-c-Met antibody, inhibits orthotopic pancreatic tumor growth and improves survival. *Cancer Res* 68, 4360-8.

Jo, M., Stolz, D. B., Esplen, J. E., Dorko, K., Michalopoulos, G. K. and Strom, S. C. (2000). Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *J Biol Chem* 275, 8806-11.

Judson, M. C., Bergman, M. Y., Campbell, D. B., Eagleson, K. L. and Levitt, P. (2009). Dynamic gene and protein expression patterns of the autism-associated met receptor tyrosine kinase in the developing mouse forebrain. *J Comp Neurol* 513, 511-31.

Kamei, T., Matozaki, T., Sakisaka, T., Kodama, A., Yokoyama, S., Peng, Y. F., Nakano, K., Takaishi, K. and Takai, Y. (1999). Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells--regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins. *Oncogene* 18, 6776-84.

Kawaida, K., Matsumoto, K., Shimazu, H. and Nakamura, T. (1994). Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4357-61.

Kemp, L. E., Mulloy, B. and Gherardi, E. (2006). Signalling by HGF/SF and Met: the role of heparan sulphate co-receptors. *Biochem Soc Trans* 34, 414-7.

Kermorgant, S. and Parker, P. J. (2008). Receptor trafficking controls weak signal delivery: a strategy used by c-Met for STAT3 nuclear accumulation. *J Cell Biol* 182, 855-63.

Kermorgant, S., Zicha, D. and Parker, P. J. (2003). Protein kinase C controls microtubule-based traffic but not proteasomal degradation of c-Met. *J Biol Chem* 278, 28921-9.

Kermorgant, S., Zicha, D. and Parker, P. J. (2004). PKC controls HGF-dependent c-Met traffic, signalling and cell migration. *Embo J* 23, 3721-34.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57.

Kessenbrock, K., Plaks, V. and Werb, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141, 52-67.

Kirchhofer, D., Yao, X., Peek, M., Eigenbrot, C., Lipari, M. T., Billeci, K. L., Maun, H. R., Moran, P., Santell, L., Wiesmann, C. (2004). Structural and functional basis of the serine protease-like hepatocyte growth factor beta-chain in Met binding and signaling. *J Biol Chem* 279, 39915-24.

Kolodkin, A. L., Matthes, D. J. and Goodman, C. S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75, 1389-99.

Komada, M., Hatsuzawa, K., Shibamoto, S., Ito, F., Nakayama, K. and Kitamura, N. (1993). Proteolytic processing of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor by furin. *FEBS Lett* 328, 25-9.

Komada, M. and Kitamura, N. (1995). Growth factor-induced tyrosine phosphorylation of Hrs, a novel 115-kilodalton protein with a structurally conserved putative zinc finger domain. *Mol Cell Biol* 15, 6213-21.

Kong-Beltran, M., Seshagiri, S., Zha, J., Zhu, W., Bhawe, K., Mendoza, N., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Fu, L. (2006). Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer Res* 66, 283-9.

Kong-Beltran, M., Stamos, J. and Wickramasinghe, D. (2004). The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation. *Cancer Cell* 6, 75-84.

Koochekpour, S., Jeffers, M., Rulong, S., Taylor, G., Klineberg, E., Hudson, E. A., Resau, J. H. and Vande Woude, G. F. (1997). Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res* 57, 5391-8.

Krishnaswamy, S., Kanteti, R., Duke-Cohan, J. S., Loganathan, S., Liu, W., Ma, P. C., Sattler, M., Singleton, P. A., Ramnath, N., Innocenti, F. et al. (2009). Ethnic

differences and functional analysis of MET mutations in lung cancer. *Clin Cancer Res* 15, 5714-23.

La Rosa, S., Uccella, S., Capella, C., Erba, S. and Sessa, F. (2000). Localization of Hepatocyte Growth Factor and Its Receptor met in Endocrine Cells and Related Tumors of the Gut and Pancreas: An Immunohistochemical Study. *Endocr Pathol* 11, 315-329.

Lai, A. Z., Abella, J. V. and Park, M. (2009). Crosstalk in Met receptor oncogenesis. *Trends Cell Biol* 19, 542-51.

Latimer, A. J. and Jessen, J. R. (2008). Hgf/c-met expression and functional analysis during zebrafish embryogenesis. *Dev Dyn* 237, 3904-15.

Lee, J. H., Han, S. U., Cho, H., Jennings, B., Gerrard, B., Dean, M., Schmidt, L., Zbar, B. and Vande Woude, G. F. (2000). A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer. *Oncogene* 19, 4947-53.

Leonardi, R., Caltabiano, R. and Loreto, C. (2009). The immunolocalization and possible role of c-Met (MET, hepatic growth factor receptor) in the developing human fetal mandibular condyle. *Acta Histochem.*

Levy, D. E. and Darnell, J. E., Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 651-62.

Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B. and Schlessinger, J. (1993). Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* 363, 85-8.

Lin, J. C., Naujokas, M., Zhu, H., Nolet, S. and Park, M. (1998). Intron-exon structure of the MET gene and cloning of an alternatively-spliced Met isoform reveals frequent exon-skipping of a single large internal exon. *Oncogene* 16, 833-42.

Liu, X., Newton, R. C. and Scherle, P. A. Developing c-MET pathway inhibitors for cancer therapy: progress and challenges. *Trends Mol Med* 16, 37-45.

Liu, Y., Chattopadhyay, N., Qin, S., Szekeres, C., Vasylyeva, T., Mahoney, Z. X., Taglienti, M., Bates, C. M., Chapman, H. A., Miner, J. H. (2009). Coordinate integrin and c-Met signaling regulate Wnt gene expression during epithelial morphogenesis. *Development* 136, 843-53.

Lock, L. S., Frigault, M. M., Saucier, C. and Park, M. (2003). Grb2-independent recruitment of Gab1 requires the C-terminal lobe and structural integrity of the Met receptor kinase domain. *J Biol Chem* 278, 30083-90.

Lock, L. S., Royal, I., Naujokas, M. A. and Park, M. (2000). Identification of an atypical Grb2 carboxyl-terminal SH3 domain binding site in Gab docking proteins reveals

Grb2-dependent and -independent recruitment of Gab1 to receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 275, 31536-45.

Lokker, N. A., Mark, M. R., Luis, E. A., Bennett, G. L., Robbins, K. A., Baker, J. B. and Godowski, P. J. (1992). Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *Embo J* 11, 2503-10.

Longati, P., Bardelli, A., Ponzetto, C., Naldini, L. and Comoglio, P. M. (1994). Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene* 9, 49-57.

Loreto, C., Musumeci, G., Caltabiano, R., Caltabiano, C. and Leonardi, R. (2009). Immunolocalization of hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in human fetal tooth germ. *Ital J Anat Embryol* 114, 87-95.

Lyon, M., Deakin, J. A., Mizuno, K., Nakamura, T. and Gallagher, J. T. (1994). Interaction of hepatocyte growth factor with heparan sulfate. Elucidation of the major heparan sulfate structural determinants. *J Biol Chem* 269, 11216-23.

Lyon, M., Deakin, J. A., Rahmoune, H., Fernig, D. G., Nakamura, T. and Gallagher, J. T. (1998). Hepatocyte growth factor/scatter factor binds with high affinity to dermatan sulfate. *J Biol Chem* 273, 271-8.

Ma, P. C., Jagadeeswaran, R., Jagadeesh, S., Tretiakova, M. S., Nallasura, V., Fox, E. A., Hansen, M., Schaefer, E., Naoki, K., Lader, A. et al. (2005). Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 65, 1479-88.

Ma, P. C., Kijima, T., Maulik, G., Fox, E. A., Sattler, M., Griffin, J. D., Johnson, B. E. and Salgia, R. (2003). c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res* 63, 6272-81.

Ma, P. C., Tretiakova, M. S., MacKinnon, A. C., Ramnath, N., Johnson, C., Dietrich, S., Seiwert, T., Christensen, J. G., Jagadeeswaran, R., Krausz, T. (2008). Expression and mutational analysis of MET in human solid cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 1025-37.

Maina, F., Casagrande, F., Audero, E., Simeone, A., Comoglio, P. M., Klein, R. and Ponzetto, C. (1996). Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* 87, 531-42.

Maina, F., Hilton, M. C., Ponzetto, C., Davies, A. M. and Klein, R. (1997). Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes Dev* 11, 3341-50.

Maina, F. and Klein, R. (1999). Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nat Neurosci* 2, 213-7.

Maina, F., Pante, G., Helmbacher, F., Andres, R., Porthin, A., Davies, A. M., Ponzetto, C. and Klein, R. (2001). Coupling Met to specific pathways results in distinct developmental outcomes. *Mol Cell* 7, 1293-306.

Marchetti, P. (2005). [Apoptosis: basic knowledge and applications]. *Gynecol Obstet Fertil* 33, 632-41.

Martens, T., Schmidt, N. O., Eckerich, C., Fillbrandt, R., Merchant, M., Schwall, R., Westphal, M. and Lamszus, K. (2006). A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo. *Clin Cancer Res* 12, 6144-52.

Martins, G. J., Plachez, C. and Powell, E. M. (2007). Loss of embryonic MET signaling alters profiles of hippocampal interneurons. *Dev Neurosci* 29, 143-58.

Massague, J. and Pandiella, A. (1993). Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 62, 515-41.

Matsumoto, K., Kataoka, H., Date, K. and Nakamura, T. (1998). Cooperative interaction between alpha- and beta-chains of hepatocyte growth factor on c-Met receptor confers ligand-induced receptor tyrosine phosphorylation and multiple biological responses. *J Biol Chem* 273, 22913-20.

Matsumoto, K. and Nakamura, T. (2003). NK4 (HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor) in cancer biology and therapeutics. *Cancer Sci* 94, 321-7.

Matsumoto, K. and Nakamura, T. (2006). Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions. *Int J Cancer* 119, 477-83.

Matsumoto, K. and Nakamura, T. (2008). NK4 gene therapy targeting HGF-Met and angiogenesis. *Front Biosci* 13, 1943-51.

Matthews, V., Schuster, B., Schutze, S., Bussmeyer, I., Ludwig, A., Hundhausen, C., Sadowski, T., Saftig, P., Hartmann, D., Kallen, K. J. et al. (2003). Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem* 278, 38829-39.

Matzke, A., Sargsyan, V., Holtmann, B., Aramuni, G., Asan, E., Sendtner, M., Pace, G., Howells, N., Zhang, W., Ponta, H. et al. (2007). Haploinsufficiency of c-Met in

cd44^{-/-} mice identifies a collaboration of CD44 and c-Met in vivo. *Mol Cell Biol* 27, 8797-806.

Maulik, G., Shrikhande, A., Kijima, T., Ma, P. C., Morrison, P. T. and Salgia, R. (2002). Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 41-59.

Mazelin, L., Bernet, A., Bonod-Bidaud, C., Pays, L., Arnaud, S., Gespach, C., Bredezen, D. E., Scoazec, J. Y. and Mehlen, P. (2004). Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 431, 80-4.

Mazzone, M., Basilico, C., Cavassa, S., Pennacchietti, S., Risio, M., Naldini, L., Comoglio, P. M. and Michieli, P. (2004). An uncleavable form of pro-scatter factor suppresses tumor growth and dissemination in mice. *J Clin Invest* 114, 1418-32.

McDermott, U., Sharma, S. V., Dowell, L., Greninger, P., Montagut, C., Lamb, J., Archibald, H., Raudales, R., Tam, A., Lee, D. (2007). Identification of genotype-correlated sensitivity to selective kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19936-41.

Meyer, R. D., Singh, A. J. and Rahimi, N. (2004). The carboxyl terminus controls ligand-dependent activation of VEGFR-2 and its signaling. *J Biol Chem* 279, 735-42.

Michieli, P., Mazzone, M., Basilico, C., Cavassa, S., Sottile, A., Naldini, L. and Comoglio, P. M. (2004). Targeting the tumor and its microenvironment by a dual-function decoy Met receptor. *Cancer Cell* 6, 61-73.

Migliore, C., Petrelli, A., Ghiso, E., Corso, S., Capparuccia, L., Eramo, A., Comoglio, P. M. and Giordano, S. (2008). MicroRNAs impair MET-mediated invasive growth. *Cancer Res* 68, 10128-36.

Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y. and Kitamura, N. (1993). Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *J Biol Chem* 268, 10024-8.

Mizuno, S., Matsumoto, K. and Nakamura, T. (2008). HGF as a renoprotective and anti-fibrotic regulator in chronic renal disease. *Front Biosci* 13, 7072-86.

Mizuno, S. and Nakamura, T. (2007). Hepatocyte growth factor: a regenerative drug for acute hepatitis and liver cirrhosis. *Regen Med* 2, 161-70.

Montesano, R., Matsumoto, K., Nakamura, T. and Orci, L. (1991). Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* 67, 901-8.

Montesano, R., Soriano, J. V., Malinda, K. M., Ponce, M. L., Bafico, A., Kleinman, H. K., Bottaro, D. P. and Aaronson, S. A. (1998). Differential effects of hepatocyte growth factor isoforms on epithelial and endothelial tubulogenesis. *Cell Growth Differ* 9, 355-65.

Munshi, N., Jeay, S., Li, Y., Chen, C. R., France, D. S., Ashwell, M. A., Hill, J., Moussa, M. M., Leggett, D. S. and Li, C. J. ARQ 197, a Novel and Selective Inhibitor of the Human c-Met Receptor Tyrosine Kinase with Antitumor Activity. *Mol Cancer Ther.*

Murphy, G. (2008). The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 8, 929-41.

Nakamura, T. (1991). Structure and function of hepatocyte growth factor. *Prog Growth Factor Res* 3, 67-85.

Nakamura, T., Mizuno, S., Matsumoto, K., Sawa, Y., Matsuda, H. and Nakamura, T. (2000). Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J Clin Invest* 106, 1511-9.

Nakamura, T., Nawa, K. and Ichihara, A. (1984). Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 122, 1450-9.

Naldini, L., Vigna, E., Ferracini, R., Longati, P., Gandino, L., Prat, M. and Comoglio, P. M. (1991a). The tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene is activated by autophosphorylation. *Mol Cell Biol* 11, 1793-803.

Naldini, L., Weidner, K. M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzetto, C., Narsimhan, R. P., Hartmann, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G. K. (1991b). Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *Embo J* 10, 2867-78.

Natali, P. G., Prat, M., Nicotra, M. R., Bigotti, A., Olivero, M., Comoglio, P. M. and Di Renzo, M. F. (1996). Overexpression of the met/HGF receptor in renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 69, 212-7.

Nath, D., Williamson, N. J., Jarvis, R. and Murphy, G. (2001). Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase. *J Cell Sci* 114, 1213-20.

Navab, R., Liu, J., Seiden-Long, I., Shih, W., Li, M., Bandarchi, B., Chen, Y., Lau, D., Zu, Y. F., Cescon, D. et al. (2009). Co-overexpression of Met and hepatocyte growth factor promotes systemic metastasis in NCI-H460 non-small cell lung carcinoma cells. *Neoplasia* 11, 1292-300.

Niki, M., Isozaki, H., Toyoda, M., Ishibashi, T., Fujii, K., Nomura, E., Mabuchi, H., Nakamura, M., Nishiguchi, K. and Tanigawa, N. (1999). Serum human hepatocyte growth factor (hHGF) is elevated in patients with metastatic gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 46, 568-73.

Niu, X. L., Peters, K. G. and Kontos, C. D. (2002). Deletion of the carboxyl terminus of Tie2 enhances kinase activity, signaling, and function. Evidence for an autoinhibitory mechanism. *J Biol Chem* 277, 31768-73.

Ohmichi, H., Matsumoto, K. and Nakamura, T. (1996). In vivo mitogenic action of HGF on lung epithelial cells: pulmotrophic role in lung regeneration. *Am J Physiol* 270, L1031-9.

Onozato, R., Kosaka, T., Kuwano, H., Sekido, Y., Yatabe, Y. and Mitsudomi, T. (2009). Activation of MET by gene amplification or by splice mutations deleting the juxtamembrane domain in primary resected lung cancers. *J Thorac Oncol* 4, 5-11.

Orian-Rousseau, V., Chen, L., Sleeman, J. P., Herrlich, P. and Ponta, H. (2002). CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev* 16, 3074-86.

Orian-Rousseau, V., Morrison, H., Matzke, A., Kastilan, T., Pace, G., Herrlich, P. and Ponta, H. (2007). Hepatocyte growth factor-induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44v6 and F-actin. *Mol Biol Cell* 18, 76-83.

Owen, K. A., Qiu, D., Alves, J., Schumacher, A. M., Kilpatrick, L. M., Li, J., Harris, J. L. and Ellis, V. Pericellular activation of hepatocyte growth factor by the transmembrane serine proteases matriptase and hepsin, but not by the membrane-associated protease uPA. *Biochem J* 426, 219-28.

Palamidessi, A., Frittoli, E., Garre, M., Faretta, M., Mione, M., Testa, I., Diaspro, A., Lanzetti, L., Scita, G. and Di Fiore, P. P. (2008). Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell* 134, 135-47.

Park, M., Dean, M., Cooper, C. S., Schmidt, M., O'Brien, S. J., Blair, D. G. and Vande Woude, G. F. (1986). Mechanism of met oncogene activation. *Cell* 45, 895-904.

Park, M., Dean, M., Kaul, K., Braun, M. J., Gonda, M. A. and Vande Woude, G. (1987). Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6379-83.

Park, M., Park, H., Kim, W. H., Cho, H. and Lee, J. H. (2005). Presence of autocrine hepatocyte growth factor-Met signaling and its role in proliferation and migration of SNU-484 gastric cancer cell line. *Exp Mol Med* 37, 213-9.

Pedersen, K., Angelini, P. D., Laos, S., Bach-Faig, A., Cunningham, M. P., Ferrer-Ramon, C., Luque-Garcia, A., Garcia-Castillo, J., Parra-Palau, J. L., Scaltriti, M. et al. (2009). A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumor growth and metastasis. *Mol Cell Biol* 29, 3319-31.

Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzone, M., Giordano, S. and Comoglio, P. M. (2003). Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 3, 347-61.

Peschard, P., Fournier, T. M., Lamorte, L., Naujokas, M. A., Band, H., Langdon, W. Y. and Park, M. (2001). Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell* 8, 995-1004.

Petrelli, A., Circosta, P., Granziero, L., Mazzone, M., Pisacane, A., Fenoglio, S., Comoglio, P. M. and Giordano, S. (2006). Ab-induced ectodomain shedding mediates hepatocyte growth factor receptor down-regulation and hampers biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5090-5.

Petrelli, A., Gilestro, G. F., Lanzardo, S., Comoglio, P. M., Migone, N. and Giordano, S. (2002). The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* 416, 187-90.

Phaneuf, D., Moscioni, A. D., LeClair, C., Raper, S. E. and Wilson, J. M. (2004). Generation of a mouse expressing a conditional knockout of the hepatocyte growth factor gene: demonstration of impaired liver regeneration. *DNA Cell Biol* 23, 592-603.

Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G. and Comoglio, P. M. (1994). A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 77, 261-71.

Prat, M., Crepaldi, T., Gandino, L., Giordano, S., Longati, P. and Comoglio, P. (1991). C-terminal truncated forms of Met, the hepatocyte growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 11, 5954-62.

Prat, M., Crepaldi, T., Pennacchietti, S., Bussolino, F. and Comoglio, P. M. (1998). Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *J Cell Sci* 111 (Pt 2), 237-47.

Prunotto, C., Crepaldi, T., Forni, P. E., Ieraci, A., Kelly, R. G., Tajbakhsh, S., Buckingham, M. and Ponzetto, C. (2004). Analysis of Mlc-lacZ Met mutants highlights the essential function of Met for migratory precursors of hypaxial muscles and reveals a role for Met in the development of hyoid arch-derived facial muscles. *Dev Dyn* 231, 582-91.

Rabkin, R., Fervenza, F., Tsao, T., Sibley, R., Friedlaender, M., Hsu, F., Lassman, C., Hausmann, M., Huie, P. and Schwall, R. H. (2001). Hepatocyte growth factor receptor in acute tubular necrosis. *J Am Soc Nephrol* 12, 531-40.

Rahimi, N., Hung, W., Tremblay, E., Saulnier, R. and Elliott, B. (1998). c-Src kinase activity is required for hepatocyte growth factor-induced motility and anchorage-independent growth of mammary carcinoma cells. *J Biol Chem* 273, 33714-21.

Raiborg, C. and Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458, 445-52.

Reshetnikova, G., Troyanovsky, S. and Rimm, D. L. (2007). Definition of a direct extracellular interaction between Met and E-cadherin. *Cell Biol Int* 31, 366-73.

Rhim, J. S., Kim, C. M., Arnstein, P., Huebner, R. J., Weisburger, E. K. and Nelson Ress, W. A. (1975). Transformation of human osteosarcoma cells by a chemical carcinogen. *J Natl Cancer Inst* 55, 1291-4.

Rodrigues, G. A. and Park, M. (1993). Dimerization mediated through a leucine zipper activates the oncogenic potential of the met receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 13, 6711-22.

Romeo, G., Ronchetto, P., Luo, Y., Barone, V., Seri, M., Ceccherini, I., Pasini, B., Bocciardi, R., Lerone, M., Kaariainen, H. (1994). Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367, 377-8.

Rong, S., Donehower, L. A., Hansen, M. F., Strong, L., Tainsky, M., Jeffers, M., Resau, J. H., Hudson, E., Tsarfaty, I. and Vande Woude, G. F. (1995). Met proto-oncogene product is overexpressed in tumors of p53-deficient mice and tumors of Li-Fraumeni patients. *Cancer Res* 55, 1963-70.

Rong, S., Segal, S., Anver, M., Resau, J. H. and Vande Woude, G. F. (1994). Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4731-5.

Sachs, M., Brohmann, H., Zechner, D., Muller, T., Hulsken, J., Walther, I., Schaeper, U., Birchmeier, C. and Birchmeier, W. (2000). Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo. *J Cell Biol* 150, 1375-84.

Sakata, H., Stahl, S. J., Taylor, W. G., Rosenberg, J. M., Sakaguchi, K., Wingfield, P. T. and Rubin, J. S. (1997). Heparin binding and oligomerization of hepatocyte growth factor/scatter factor isoforms. Heparan sulfate glycosaminoglycan requirement for Met binding and signaling. *J Biol Chem* 272, 9457-63.

Saucier, C., Khoury, H., Lai, K. M., Peschard, P., Dankort, D., Naujokas, M. A., Holash, J., Yancopoulos, G. D., Muller, W. J., Pawson, T. et al. (2004). The Shc adaptor protein is critical for VEGF induction by Met/HGF and ErbB2 receptors and for early onset of tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2345-50.

Scarpino, S., Cancellario d'Alena, F., Di Napoli, A., Pasquini, A., Marzullo, A. and Ruco, L. P. (2004). Increased expression of Met protein is associated with up-regulation of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) in tumour cells in papillary carcinoma of the thyroid. *J Pathol* 202, 352-8.

Schaeper, U., Gehring, N. H., Fuchs, K. P., Sachs, M., Kempkes, B. and Birchmeier, W. (2000). Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J Cell Biol* 149, 1419-32.

Schelter, F., Kobuch, J., Moss, M. L., Becherer, J. D., Comoglio, P. M., Boccaccio, C. and Kruger, A. (2000). A Disintegrin and Metalloproteinase-10 (ADAM-10) Mediates DN30 Antibody-induced Shedding of the Met Surface Receptor. *J Biol Chem* 275, 26335-40.

Schirrmester, W., Gnad, T., Wex, T., Higashiyama, S., Wolke, C., Naumann, M. and Lendeckel, U. (2009). Ectodomain shedding of E-cadherin and c-Met is induced by Helicobacter pylori infection. *Exp Cell Res* 315, 3500-8.

Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E. and Birchmeier, C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702.

Schmidt, L., Duh, F. M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S. W., Zhuang, Z., Lubensky, I., Dean, M. et al. (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 16, 68-73.

Seki, T., Hagiya, M., Shimonishi, M., Nakamura, T. and Shimizu, S. (1991). Organization of the human hepatocyte growth factor-encoding gene. *Gene* 102, 213-9.

Shattuck, D. L., Miller, J. K., Carraway, K. L., 3rd and Sweeney, C. (2008). Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res* 68, 1471-7.

Shattuck, D. L., Miller, J. K., Laederich, M., Funes, M., Petersen, H., Carraway, K. L., 3rd and Sweeney, C. (2007). LRIG1 is a novel negative regulator of the Met receptor and opposes Met and Her2 synergy. *Mol Cell Biol* 27, 1934-46.

Shimamura, M., Sato, N., Sata, M., Wakayama, K., Ogihara, T. and Morishita, R. (2007). Expression of hepatocyte growth factor and c-Met after spinal cord injury in rats. *Brain Res* 1151, 188-94.

Shimizu, M., Hara, A., Okuno, M., Matsuno, H., Okada, K., Ueshima, S., Matsuo, O., Niwa, M., Akita, K., Yamada, Y. et al. (2001). Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis. *Hepatology* 33, 569-76.

Siegfried, J. M., Weissfeld, L. A., Singh-Kaw, P., Weyant, R. J., Testa, J. R. and Landreneau, R. J. (1997). Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 57, 433-9.

Singleton, P. A., Salgia, R., Moreno-Vinasco, L., Moitra, J., Sammani, S., Mirzapour, T. and Garcia, J. G. (2007). CD44 regulates hepatocyte growth factor-mediated vascular integrity. Role of c-Met, Tiam1/Rac1, dynamin 2, and cortactin. *J Biol Chem* 282, 30643-57.

Smolen, G. A., Sordella, R., Muir, B., Mohapatra, G., Barmettler, A., Archibald, H., Kim, W. J., Okimoto, R. A., Bell, D. W., Sgroi, D. C. et al. (2006). Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2316-21.

Sorensen, V., Wiedlocha, A., Haugsten, E. M., Khnykin, D., Wesche, J. and Olsnes, S. (2006). Different abilities of the four FGFRs to mediate FGF-1 translocation are linked to differences in the receptor C-terminal tail. *J Cell Sci* 119, 4332-41.

Soriano, J. V., Pepper, M. S., Orci, L. and Montesano, R. (1998). Roles of hepatocyte growth factor/scatter factor and transforming growth factor-beta1 in mammary gland ductal morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3, 133-50.

Stamos, J., Lazarus, R. A., Yao, X., Kirchhofer, D. and Wiesmann, C. (2004). Crystal structure of the HGF beta-chain in complex with the Sema domain of the Met receptor. *Embo J* 23, 2325-35.

Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M. and Vogt, P. K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260, 170-3.

Sternlicht, M. D. and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516.

Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M. and Gray, J. (1987). Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 327, 239-42.

Tanaka, N., Kyuuma, M. and Sugamura, K. (2008). Endosomal sorting complex required for transport proteins in cancer pathogenesis, vesicular transport, and non-endosomal functions. *Cancer Sci* 99, 1293-303.

Tate, A., Isotani, S., Bradley, M. J., Sikes, R. A., Davis, R., Chung, L. W. and Edlund, M. (2006). Met-Independent Hepatocyte Growth Factor-mediated regulation of cell adhesion in human prostate cancer cells. *BMC Cancer* 6, 197.

Tempest, P. R., Stratton, M. R. and Cooper, C. S. (1988). Structure of the met protein and variation of met protein kinase activity among human tumour cell lines. *Br J Cancer* 58, 3-7.

Toi, M., Taniguchi, T., Ueno, T., Asano, M., Funata, N., Sekiguchi, K., Iwanari, H. and Tominaga, T. (1998). Significance of circulating hepatocyte growth factor level as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 4, 659-64.

Toiyama, Y., Miki, C., Inoue, Y., Okugawa, Y., Tanaka, K. and Kusunoki, M. (2009). Serum hepatocyte growth factor as a prognostic marker for stage II or III colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 125, 1657-62.

Tokunou, M., Niki, T., Eguchi, K., Iba, S., Tsuda, H., Yamada, T., Matsuno, Y., Kondo, H., Saitoh, Y., Imamura, H. et al. (2001). c-MET expression in myofibroblasts: role in autocrine activation and prognostic significance in lung adenocarcinoma. *Am J Pathol* 158, 1451-63.

Toschi, L. and Cappuzzo, F. Clinical implications of MET gene copy number in lung cancer. *Future Oncol* 6, 239-47.

Trusolino, L., Bertotti, A. and Comoglio, P. M. (2001). A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell* 107, 643-54.

Tsao, H., Zhang, X., Kwitkiwski, K., Finkelstein, D. M., Sober, A. J. and Haluska, F. G. (2000). Low prevalence of germline CDKN2A and CDK4 mutations in patients with early-onset melanoma. *Arch Dermatol* 136, 1118-22.

Tuck, A. B., Park, M., Sterns, E. E., Boag, A. and Elliott, B. E. (1996). Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 148, 225-32.

Tulasne, D., Deheuninck, J., Lourenco, F. C., Lamballe, F., Ji, Z., Leroy, C., Puchois, E., Moumen, A., Maina, F., Mehlen, P. et al. (2004). Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. *Mol Cell Biol* 24, 10328-39.

Tulasne, D. and Foveau, B. (2008). The shadow of death on the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ* 15, 427-34.

Tulasne, D., Paumelle, R., Leroy, C., Reveneau, S., Vandenbunder, B. and Fafeur, V. (2002). Involvement of RAS-ERK signaling in multiple biological responses to HGF/SF. *Ann N Y Acad Sci* 973, 105-8.

Tulasne, D., Paumelle, R., Weidner, K. M., Vandenbunder, B. and Fafeur, V. (1999). The multisubstrate docking site of the MET receptor is dispensable for MET-mediated RAS signaling and cell scattering. *Mol Biol Cell* 10, 551-65.

Tyner, J. W., Fletcher, L. B., Wang, E. Q., Yang, W. F., Rutenberg-Schoenberg, M. L., Beadling, C., Mori, M., Heinrich, M. C., Deininger, M. W., Druker, B. J. MET receptor sequence variants R970C and T992I lack transforming capacity. *Cancer Res* 70, 6233-7.

Uehara, Y. and Kitamura, N. (1996). Hepatocyte growth factor/scatter factor and the placenta. *Placenta* 17, 97-101.

Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shiota, K., Kuno, J., Noda, T. and Kitamura, N. (1995). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373, 702-5.

Vaisanen, T., Vaisanen, M. R. and Pihlajaniemi, T. (2006). Modulation of the cellular cholesterol level affects shedding of the type XIII collagen ectodomain. *J Biol Chem* 281, 33352-62.

van der Voort, R., Taher, T. E., Wielenga, V. J., Spaargaren, M., Prevo, R., Smit, L., David, G., Hartmann, G., Gherardi, E. and Pals, S. T. (1999). Heparan sulfate-modified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor-induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met. *J Biol Chem* 274, 6499-506.

Van Zee, K. J., Kohno, T., Fischer, E., Rock, C. S., Moldawer, L. L. and Lowry, S. F. (1992). Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4845-9.

Vanhaesebroeck, B., Ali, K., Bilancio, A., Geering, B. and Foukas, L. C. (2005). Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci* 30, 194-204.

von Tresckow, B., Kallen, K. J., von Strandmann, E. P., Borchmann, P., Lange, H., Engert, A. and Hansen, H. P. (2004). Depletion of cellular cholesterol and lipid rafts increases shedding of CD30. *J Immunol* 172, 4324-31.

Wajih, N., Walter, J. and Sane, D. C. (2002). Vascular origin of a soluble truncated form of the hepatocyte growth factor receptor (c-met). *Circ Res* 90, 46-52.

Wang, L., Rahn, J. J., Lun, X., Sun, B., Kelly, J. J., Weiss, S., Robbins, S. M., Forsyth, P. A. and Senger, D. L. (2008). Gamma-secretase represents a therapeutic target for the treatment of invasive glioma mediated by the p75 neurotrophin receptor. *PLoS Biol* 6, e289.

Wang, R., Kobayashi, R. and Bishop, J. M. (1996). Cellular adherence elicits ligand-independent activation of the Met cell-surface receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8425-30.

Wang, W., Marimuthu, A., Tsai, J., Kumar, A., Krupka, H. I., Zhang, C., Powell, B., Suzuki, Y., Nguyen, H., Tabrizizad, M. et al. (2006). Structural characterization of autoinhibited c-Met kinase produced by coexpression in bacteria with phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3563-8.

Wang, X., DeFrances, M. C., Dai, Y., Padiaditakis, P., Johnson, C., Bell, A., Michalopoulos, G. K. and Zarnegar, R. (2002). A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol Cell* 9, 411-21.

Weidner, K. M., Sachs, M. and Birchmeier, W. (1993). The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J Cell Biol* 121, 145-54.

Weidner, K. M., Sachs, M., Riethmacher, D. and Birchmeier, W. (1995). Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2597-601.

Weinstein, I. B. and Joe, A. (2008). Oncogene addiction. *Cancer Res* 68, 3077-80; discussion 3080.

Wielenga, V. J., van der Voort, R., Taher, T. E., Smit, L., Beuling, E. A., van Krimpen, C., Spaargaren, M. and Pals, S. T. (2000). Expression of c-Met and heparan-sulfate proteoglycan forms of CD44 in colorectal cancer. *Am J Pathol* 157, 1563-73.

Wilhelmsen, K., Litjens, S. H. and Sonnenberg, A. (2006). Multiple functions of the integrin alpha6beta4 in epidermal homeostasis and tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 26, 2877-86.

Willems, S. H., Tape, C. J., Stanley, P. L., Taylor, N. A., Mills, I. G., Neal, D. E., McCafferty, J. and Murphy, G. Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *Biochem J* 428, 439-50.

Woolford, J., McAuliffe, A. and Rohrschneider, L. R. (1988). Activation of the feline c-fms proto-oncogene: multiple alterations are required to generate a fully transformed phenotype. *Cell* 55, 965-77.

Xu, K. P. and Yu, F. S. (2007). Cross talk between c-Met and epidermal growth factor receptor during retinal pigment epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 2242-8.

Yamashita, J., Ogawa, M., Yamashita, S., Nomura, K., Kuramoto, M., Saishoji, T. and Shin, S. (1994). Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. *Cancer Res* 54, 1630-3.

Yang, J. Y., Michod, D., Walicki, J., Murphy, B. M., Kasibhatla, S., Martin, S. J. and Widmann, C. (2004). Partial cleavage of RasGAP by caspases is required for cell survival in mild stress conditions. *Mol Cell Biol* 24, 10425-36.

Yang, J. Y. and Widmann, C. (2001). Antiapoptotic signaling generated by caspase-induced cleavage of RasGAP. *Mol Cell Biol* 21, 5346-58.

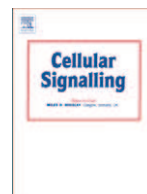
Yokoyama, N., Ischenko, I., Hayman, M. J. and Miller, W. T. (2005). The C terminus of RON tyrosine kinase plays an autoinhibitory role. *J Biol Chem* 280, 8893-900.

Zachow, R. and Uzumcu, M. (2007). The hepatocyte growth factor system as a regulator of female and male gonadal function. *J Endocrinol* 195, 359-71.

Zeng, Z. S., Weiser, M. R., Kuntz, E., Chen, C. T., Khan, S. A., Forslund, A., Nash, G. M., Gimbel, M., Yamaguchi, Y., Culliford, A. T. (2008). c-Met gene amplification is associated with advanced stage colorectal cancer and liver metastases. *Cancer Lett* 265, 258-69.

Zhang, Y., Guessous, F., Kofman, A., Schiff, D. and Abounader, R. XL-184, a MET, VEGFR-2 and RET kinase inhibitor for the treatment of thyroid cancer, glioblastoma multiforme and NSCLC. *IDrugs* 13, 112-21.

ANNEXES



Phosphorylation of the MET receptor on juxtamembrane tyrosine residue 1001 inhibits its caspase-dependent cleavage[☆]

Julien Deheuninck¹, Gautier Goormachtigh, Bénédicte Foveau, Zongling Ji², Catherine Leroy, Frédéric Ancot, Vincent Villeret, David Tulasne, Véronique Fafeur^{*}

CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, Université Lille-Nord de France, Institut Pasteur de Lille, IFR142, 1, rue du Pr Calmette, BP 447, 59021 LILLE, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 April 2009

Accepted 11 May 2009

Available online 18 May 2009

Keywords:

HGF

MET

Caspase

CBL

Phosphorylation

Apoptosis

ABSTRACT

The MET tyrosine kinase is the hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) receptor, which elicits multiple biological responses in epithelial cells, including cell survival. We previously demonstrated that in stress conditions, the MET receptor is cleaved by caspases within its juxtamembrane region, generating a pro-apoptotic intracellular fragment of 40 kDa. The caspase cleavage site at aspartic acid D1000 is adjacent to tyrosine Y1001, which when phosphorylated upon MET activation, is involved in CBL recruitment, allowing receptor ubiquitination and down regulation. Scanning mutagenesis of the MET juxtamembrane region led us to demonstrate that V999 and D1000 are essential for the caspase cleavage, while D1000 and Y1001 are essential for CBL recruitment. By examining whether overlapping of these sites leads to a functional interference, an inverse relationship was found between generation of p40 MET and phosphorylation of MET, with a direct involvement of phosphorylated Y1001 in protecting MET against its caspase cleavage. A molecular modeling analysis of caspase 3 interaction with the juxtamembrane region of MET confirmed that phosphorylation of this tyrosine is not compatible with its recognition by active caspase 3. These data demonstrate a direct protection mechanism of an activated phosphorylated MET receptor, against its caspase-dependent cleavage.

Crown Copyright © 2009 Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The MET tyrosine kinase receptor is the high affinity receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF). Signaling via this receptor–ligand pair induces numerous biological responses in epithelial cells, such as proliferation, survival, scattering or morphogenesis [reviewed in [1,2]]. HGF/SF and MET are essential for embryonic development, since their respective knock-out results in embryonic lethality in mice, with similar defaults in placenta or liver formation [3–5]. HGF/SF–MET are involved in physiological processes in adults, like mammary gland development and renal or liver regeneration. Aberrant MET signaling is associated with tumorigenesis and metastatic progression, involving HGF/SF and/or MET overexpression, MET amplification, or activating mutations in the MET sequence, which were initially found in hereditary papillary renal cancers [6].

The MET receptor comprises an extracellular part necessary for HGF/SF binding and receptor dimerization, and an intracellular part containing the juxtamembrane region, the tyrosine kinase domain and a C-terminal region [1,2]. In contrast to other MET receptor parts, the intracellular juxtamembrane region of MET was originally described to negatively regulate the receptor. This was evidenced using the oncogenic form of MET, the TPR–MET fusion, which contains the MET intracellular part without the juxtamembrane region. Reintroduction of this region into TPR–MET, severely impaired its signaling and transforming properties [7]. In addition, somatic intronic mutations of MET sequence, discovered in lung cancer, result in deletion of the juxtamembrane region and cause prolonged stability and sustained activation of MET upon ligand stimulation [8].

Several regulatory sites have been mapped in the MET juxtamembrane region, including negative regulatory sites Y1001 and S983 involved in down regulation of the receptor [9–12]. In addition, activating mutations (R968C, P991S and T992I) discovered in cancers, may bypass normal MET down regulation [13–15]. Among these negative regulatory sites, Y1001 has received most interest since it plays a crucial role in the down regulation of MET [10–12]. This tyrosine residue is phosphorylated upon MET activation and allows interaction with the N-terminal tyrosine kinase binding domain of the E3 ubiquitin ligase CBL [10]. This recruitment leads to ubiquitination of the receptor and causes MET intracellular trafficking and

[☆] In this work, all amino acid numbers are based on the MET murine sequence, with a + 2 corresponding amino-acid number in the human sequence.

^{*} Corresponding author. Tel.: +33 320 87 10 91; fax: +33 320 87 11 11.

E-mail address: veronique.fafeur@ibl.fr (V. Fafeur).

¹ Present address: UC Berkeley, Department of Molecular and Cellular Biology, 16 Barker Hall, mail code 3204, Berkeley, CA 94720, USA.

² Present address: Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Michael Smith Building, Oxford Road, Manchester, M13 9PT, UK.

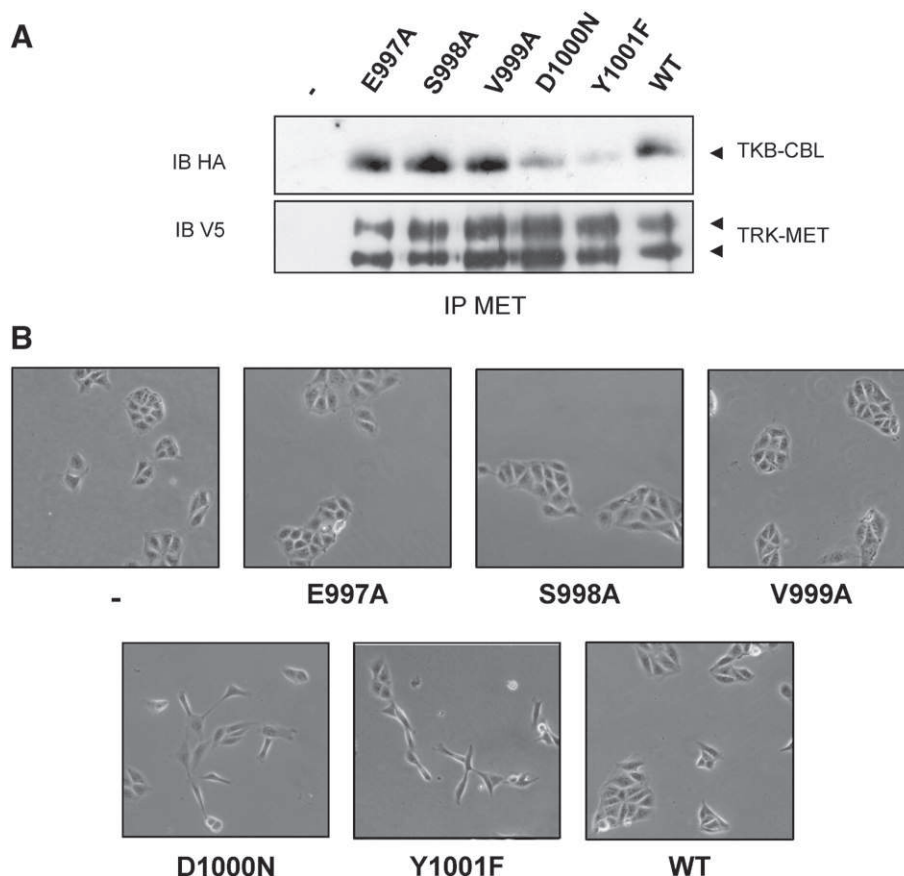


Fig. 1. D1000 and Y1001 residues are required for recruitment of the CBL–TKB domain to the MET receptor. **A.** HEK293 cells were transiently co-transfected with plasmids expressing HA-tagged TKB–CBL and empty vector (–), V5-tagged TRK–MET WT or mutants (ratio 3/4–1/4, respectively). Cell lysates were subjected to immunoprecipitation (IP) using anti-MET antibody. Samples were resolved in 10% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using anti-HA antibody. The membrane was reprobed with anti-V5 antibody. The arrowheads indicate the positions of p150 TRK–MET (fully glycosylated) and p125 TRK–MET (partially glycosylated). **B.** MDCK cells stably expressing empty vector (–), TRK–MET WT or mutants E997A, S998A, V999A, D1000N and Y1001F were seeded at low confluence (2500 cells/12-well plates) and pictures were taken the following day.

degradation [16–18]. Replacement of this tyrosine by a non-phosphorylatable residue, which prevents recruitment of the CBL–TKB domain, significantly reduces ubiquitination of the receptor, and leads to enhanced receptor stability and oncogenic activation [10]. It was further demonstrated that mutation of surrounding amino acids D1000 and R1002 of Y1001, also causes a loss of association to CBL and induces cell transformation, indicating that DpYR sequence is the functional motif recognition for CBL [11,19].

We identified another important regulatory site in the juxtamembrane region, the aspartic acid residue D1000, which is a cleavage caspase site. This cleavage occurs in response to stress and splits the receptor, leading to generation of an extracellular membrane-bound fragment (p100 MET) acting as a decoy MET receptor [20] and of a cytoplasmic fragment containing the kinase domain, which is itself pro-apoptotic [21]. The cytoplasmic fragment, called p40 MET, is in fact generated through an additional caspase cleavage, within the extreme C-terminal region of MET, which removes only few amino acids [22]. In response to stress, generation of p40 MET contributes to

amplification of apoptosis, evidencing original functions of the MET receptor according to environmental conditions [20–22].

Caspases recognize at least four contiguous amino acids in their substrates, upstream of the cleaved C-terminal residue [23]. Therefore, the ESVD¹⁰⁰⁰ sequence of MET might fit a caspase recognition motif, that we explored by scanning mutagenesis. Overlapping of the caspase cleavage recognition sequence with the CBL recruitment sequence, DpY¹⁰⁰¹R, led us to examine their possible functional interference.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture, antibodies and other reagents

Madin–Darby Canine Kidney (MDCK) epithelial cells, HeLa cells and HEK293 human embryonic kidney cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL) and antibiotics. Human recombinant HGF/SF was purchased from Peprotech. Anisomycin and MG101

Fig. 2. V999A and D1000N residues are required for the caspase cleavage of MET. **A.** MDCK cells were transiently transfected with plasmids expressing TRK–MET WT or mutants. Protein lysates were collected in caspase buffer and incubated with purified active caspase 3, as indicated. After 4 h incubation at 37 °C, proteins were immunoblotted using anti-MET antibody. **B.** MDCK cells were transiently transfected with plasmids expressing TRK–MET WT or mutants. The following day, cells were treated or not with staurosporin (100 nM) for 8 h. Cells were scrapped and proteins were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-MET antibody. The membrane was reprobed with anti-phospho Y1001 MET antibodies. The same cellular extracts were separated by 12% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-active caspase 3 antibody or anti-phospho Y1232–1233 MET antibody. The arrowheads indicate positions of p150 and p125 TRK–MET, of p40 MET fragment and of active caspase 3. The asterisk indicates position of endogenous MET phosphorylated on Y1001. **C.** MDCK cells stably expressing empty vector, TRK–MET WT or mutants E997A, S998A, V999A, D1000N and Y1001F were treated by anisomycin (50 μM) for 10 h in the presence of MG101 (50 μM), a proteasome inhibitor. Cell extracts were immunoblotted with anti-MET antibody. The membrane was reprobed with anti-active caspase 3 antibody.

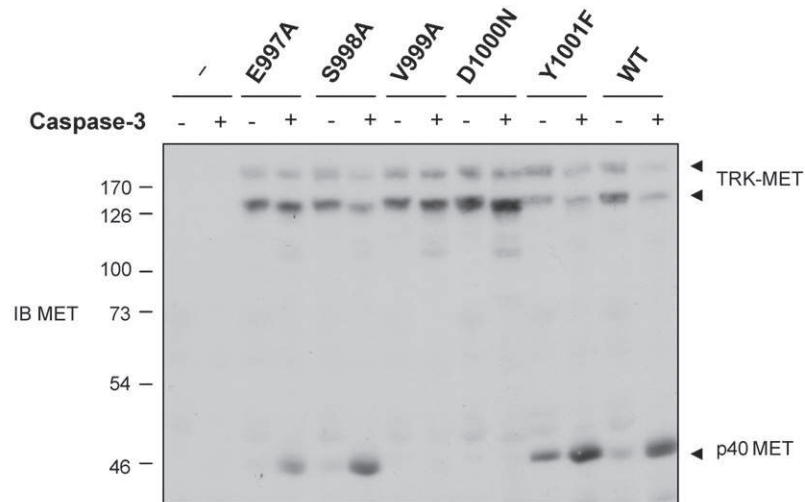
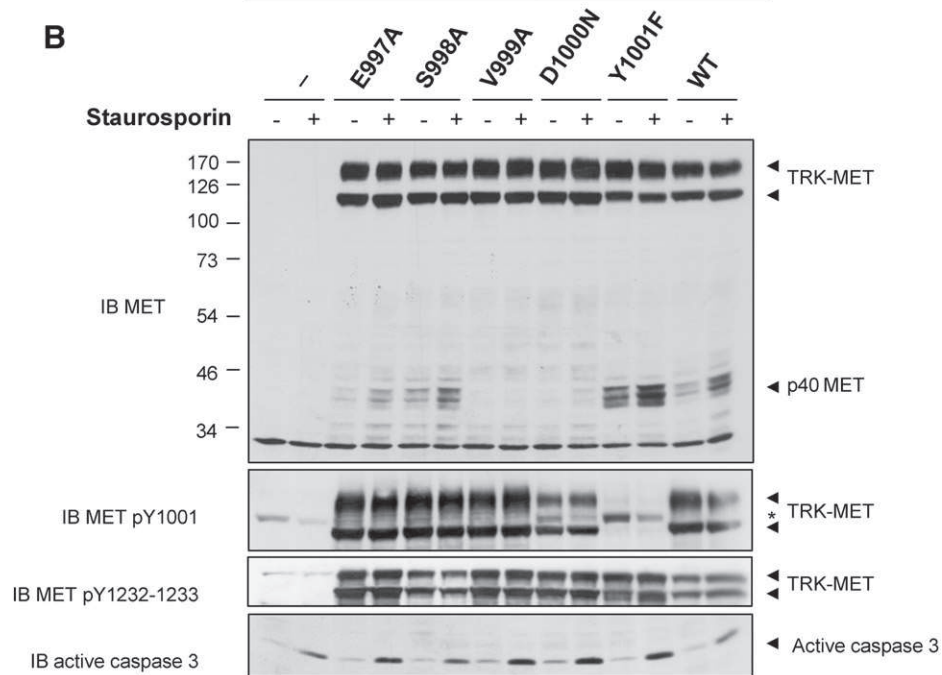
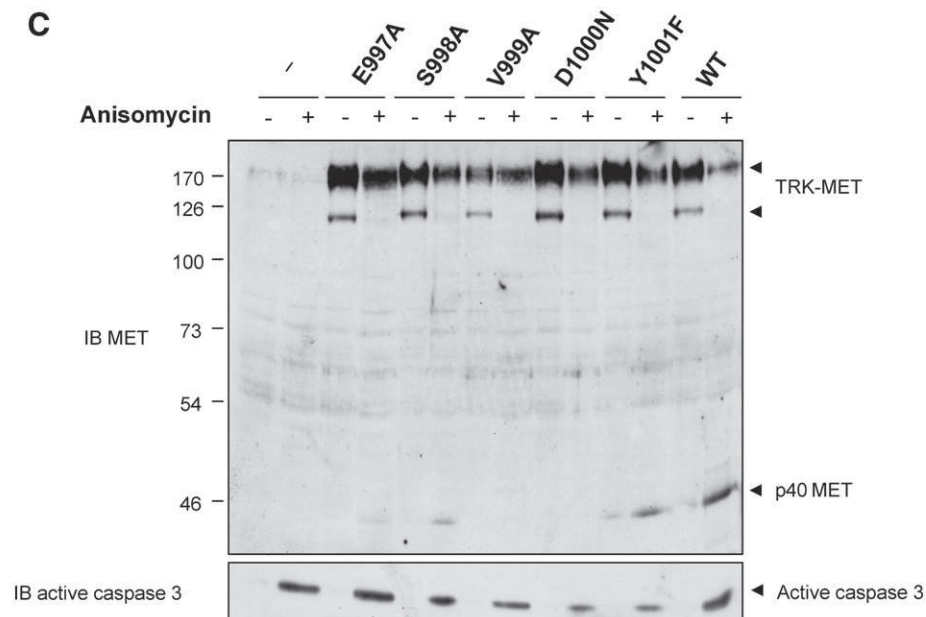
A**B****C**

Table 1
Summary of caspase cleavage and CBL interaction capacities of the MET mutants.

	E997A	S998A	V999A	D1000N	Y1001F	WT
CBL interaction	+	+	+	–	–	+
Caspase cleavage	+	+	–	–	+	+

For each mutant, their ability to be cleaved by caspase 3 or to interact with CBL (+) or not (–) is indicated.

were purchased from Calbiochem, calf intestine phosphatase (CIP) from New England Biolabs, Sodium orthovanadate (Na_3VO_4) and staurosporin from Sigma. The U0126 MEK inhibitor, LY294002 PI3K inhibitor and SU11274 MET kinase inhibitor were purchased from Promega, Biomol Research Laboratories and Calbiochem, respectively. The following MET antibodies were used: monoclonal anti-mouse intracellular MET (B-2, Santa Cruz) or monoclonal anti-human intracellular MET (3D4, Zymed Laboratories) for immunoblots, polyclonal anti-mouse intracellular MET (SP260, Santa Cruz) for immunoprecipitation, polyclonal anti-phospho Y1232–1233 MET (murine MET, 07-211, UBI; human MET, 3126, Cell Signaling Technologies) and polyclonal anti-phospho Y1001 MET (44-882, Biosource). Monoclonal anti-V5 epitope was purchased from Invitrogen, monoclonal anti-HA epitope from Babco (16B12), polyclonal anti-c-Cbl from Santa Cruz (C15) and polyclonal anti-active (cleaved) caspase 3 (#9661) from Cell Signaling Technology. Secondary antibodies used for immunoblotting were peroxidase conjugated anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch).

2.2. Plasmid constructions and siRNA

Site-directed mutagenesis was performed using QuickChange system from Stratagene, on a pGEM vector containing portion of the TRK–MET sequence between BamHI and XhoI restriction sites. The following oligonucleotides were used: E997A: 5'CAA ATG CGT CTG TAG ACT ACA GAG CTA C3', S998A: 5'CAA ATG AGG CTG TAG ACT ACA GAG CTA C3', V999A: 5' CAA ATG AGT CTG CAG ACT ACA GAG CTA C 3' and complementary primers. Insertion of the mutation was verified by sequencing. The mutated portion of TRK–MET sequence from pGEM vector was replaced in pcDNA3 TRK–MET–V5–His previously described [21], using BamHI and XhoI restriction sites. The other mutations were described previously [21,22]. Control and c-Cbl siRNA (sense, 5'-GGG AAA AGA AAG AAU GUA UTT-3'; antisense, 5'-AUA CAU UCU UUC UUU UCC CTC-3') were purchased from Eurogentec.

2.3. Transfections and stable cell lines

Transient transfection of MDCK cells (150 000 cells/6 well plates) were performed using the lipofection method, as described previously [24]. Stable MDCK cell lines were obtained after selection in geneticin (800 µg/ml, G418 sulfate, Gibco BRL) for 2 weeks. Cell clones were isolated and plasmid expression was tested by immunoblot. Transient transfection of HEK293 cells were performed with PEI/Exgen 500 (Euromedex) according to manufacturer recommendations. Transfections of siRNA were performed used lipofectamine 2000 (Invitrogen), as recommended by the manufacturer. Cells were tested 48 h after transfection.

2.4. Immunoprecipitation and immunoblotting

Immunoprecipitation was performed by adding appropriate antibody into cellular extracts, with overnight incubation at 4 °C under gentle rotation. The following day, protein A sepharose-4B (Amersham Biosciences) was added for 1 h. After 4 washes with lysis buffer, the samples were boiled in Laemmli buffer and subjected to immunoblotting, as described previously [25]. For pharmacological dephosphorylation of the receptor, the TRK–MET plasmid was transiently transfected in HEK293 cells, and then immunoprecipitated

with a MET antibody. Immunoprecipitated proteins were washed in caspase buffer and dephosphorylated using calf intestine phosphatase (CIP) for 1 h at 37 °C. Samples were then processed for caspase assay (see below). For phosphorylation of the receptor, the broad spectrum phosphatase inhibitor, sodium orthovanadate (Na_3VO_4), was used. This inhibitor (Na_3VO_4 , 5 mM) was preincubated with H_2O_2 (Merck) (2%) for 1 h at 37 °C, and then incubated for 10 min with the cells at a final concentration of 100 µM. Cells were then lysed in caspase buffer and processed for caspase assay (see below).

2.5. In vitro caspase cleavage assay

Caspase cleavages using cell extracts were performed as follows. Transfected cells were cultured 1 day in DMEM–10% FCS and then lysed in 100 µl of caspase buffer (20 mM PIPES pH 7.2; 100 mM NaCl; 1% Chaps; 10% sucrose; 5 mM DTT; 0.05 mM EDTA). Cell extracts were incubated for 4 h at 37 °C with 1 µl of purified active caspase (generously provided by Dr. G.S. Salvesen, The Burnham Institute, La Jolla, CA, USA). Proteins were then resolved on SDS-PAGE and submitted to immunoblotting.

3. Results

3.1. D1000 and Y1001 residues are required for CBL recruitment

The D1000 residue of the MET juxtamembrane region is a cleavage caspase site [21], which was also reported to contribute to CBL recruitment by phosphorylated Y1001 [11,19]. To verify its implication, several mutants were generated (E997A, S998A, V999A, D1000N, Y1001F) and were introduced into a TRK–MET expression vector, which fuses the extracellular part of the NGF receptor (TRK) and the intracellular part of MET. These chimeric receptors allow specific examinations of MET responses, upon NGF treatment [24,26]. The ability of these MET mutants to recruit CBL was evaluated in MDCK epithelial cells co-transfected with the MET receptors and the N-terminal TKB domain of CBL. Immunoprecipitation of MET was then performed, followed by CBL immunoblotting, using appropriate tag antibodies.

In agreement with data obtained in distinct experimental conditions [11,19], both MET D1000N and Y1001F have decreased interaction with the CBL–TKB domain compared to WT MET (Fig. 1A). In addition, cells stably expressing either the MET D1000N or Y1001F mutant receptors, display a phenotypic constitutive scattering (Fig. 1B) and enhanced proliferation and survival capacities [22], as expected from the loss of CBL recruitment and down regulation of MET, resulting in enhanced receptor stability [10,11]. The other mutants led to normal, non-scattered phenotype, and were not impaired in CBL recruitment, similarly to control cells (Fig. 1). The aspartic acid D1000 residue therefore contributes to the CBL recognition sequence, while it is also a caspase cleavage site.

3.2. V999 and D1000 residues are essential for the ESVD caspase recognition sequence

We next determine critical amino acids of the MET juxtamembrane region to get a caspase-dependent cleavage. MDCK cells were transiently transfected with the TRK–MET WT or mutants. Cell extracts were incubated with purified caspase 3 and generation of p40 MET was evaluated by immunoblotting using a MET antibody. As shown in Fig. 2A, p40 MET was not generated from either V999A or D1000N mutants, in contrast to Y1001F mutant or wild-type MET. Mutants E997A and S998A were much less efficient than mutants V999A or D1000N to prevent p40 MET generation, indicating that they are not crucial for the caspase cleavage recognition sequence.

Generation of p40 MET from MET mutants was also evaluated in response to apoptotic stress. Cells were transiently transfected with

the various mutants and treated the following day with an apoptosis inducer, staurosporin, for several hours (Fig. 2B). In agreement with the *in vitro* caspase cleavage assay (Fig. 2A), p40 MET was not generated from either V999A or D1000 N mutants, while E997A and S998A produced less p40 MET than Y1001F or WT MET receptor (Fig. 2B). Using MET phospho-specific antibodies, we checked phosphorylation of the mutants, caused by overexpression of the receptors in transient transfections [21]. As expected, mutant Y1001F was not phosphorylated, while MET receptors were phosphorylated to similar levels as the MET WT receptor using an anti-phosphotyrosine 1001 antibody. It should be noticed that D1000N mutant is phosphorylated on Y1001, showing that the decrease of CBL recruitment is not due to a lack of phosphorylation of this residue (Fig. 1A). All mutant and WT receptors were phosphorylated comparably on the conserved twin tyrosine residues (Y1232–1233) located in the activation loop. These tyrosines are required for full activation of the MET kinase [27]. Similar results demonstrating that V999A and D1000N are caspase uncleavable mutants were obtained in cells stably expressing the TRK–MET mutants and treated with anisomycin, another apoptosis inducer (Fig. 2C).

These data demonstrated that a V999A mutant abrogates selectively the caspase cleavage of MET, while a Y1001F mutant selectively impairs CBL recruitment, in contrast to a D1000N mutant, which affects both recognition sites (Table 1). The caspase cleavage and the

CBL interacting recognition motifs are therefore distinguishable by specific amino acid substitutions.

3.3. Modeling analysis of caspase 3 interaction with a juxtamembrane peptide of MET

Overlapping of the caspase cleavage (ESVD) and the CBL recruitment (DYR) motifs raises the question of their respective functioning in MET signaling. We examined the recognition of the MET caspase cleavage sequence using available structures of active caspase 3 in complex with various peptide-based inhibitors [28]. We took advantage of the crystal structure of a bromomethoxyphenyl inhibitor (Protein Data Bank code: 1RHQ) in complex with caspase 3, because the phenyl group of this inhibitor allowed to accurately position Y1001 from the ESVDY sequence of MET within the caspase 3 binding site. We observed that the presence of a tyrosine is favorable for MET–caspase 3 interaction, as the hydroxyl group of Y1001 may form a hydrogen bond with the carboxylate side chain of E239 (Fig. 3A), a residue showing a well conserved conformation in all reported crystal structures of caspase 3 [28]. In contrast, the negatively charged phosphoryl group of phosphorylated Y1001 collides with the negatively charged side chain carboxylate of E239 of caspase 3, causing charge repulsion and also steric hindrance (Fig. 3B). This modeling analysis shows that the

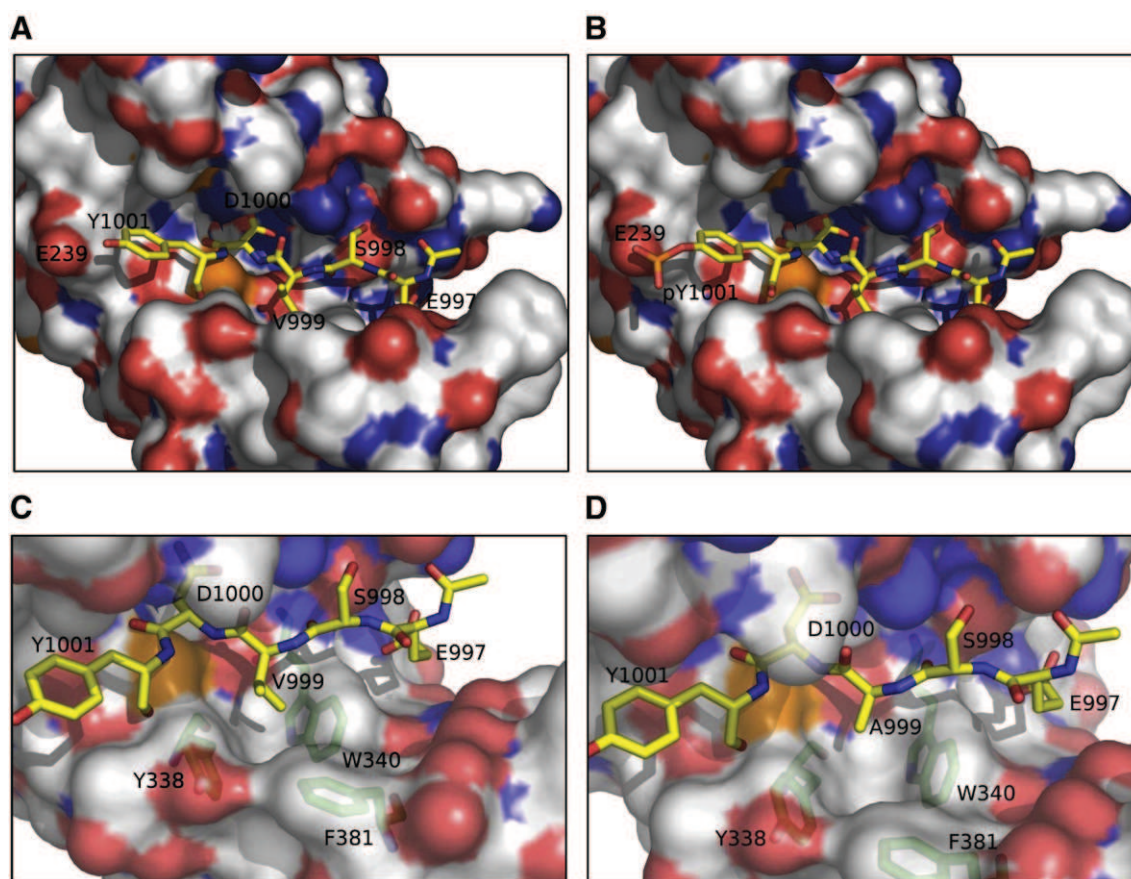


Fig. 3. Modeling of ESVDY MET peptide in caspase 3 active site. A. The MET peptide ESVDY was modeled based on the crystal structure of the complex of caspase 3 with a bromomethoxyphenyl inhibitor (PDB code: 1RHQ) [28]. This inhibitor contains, adjacent to amino acids Val-Asp, a ((methylsulfanyl)methyl)benzene group mimicking a Phe residue, thus allowing modeling the VDY sequence of the MET peptide. The hydroxyl group of the tyrosine may form a hydrogen bond with the side chain oxygen of E239. The rest of the MET peptide has been modeled based on the crystal structure of the complex of caspase 3 with an inhibitor notably containing the amino acid sequence DEVN (PDB entry code 1RHK; Becker et al., 2004), thus allowing positioning the ES adjacent to the VD residues, in the ESVDY MET peptide. The caspase 3 is represented as a molecular surface, with nitrogens colored in blue, oxygens in red, carbons in white and sulfurs in orange. The MET peptide is in sticks. B. Representation of the phosphorylated MET peptide in the caspase 3 active site. Here, the phosphorylated tyrosine lies too close to the carboxylate side chain of E239, causing charge repulsion and steric hindrance. C. Close-up view of the valine residue from the MET peptide, bound in a pocket defined by the aromatic side chains of W340, F381 and Y338 of caspase 3. The valine position is as observed in the crystal structures 1RHQ and 1RHK. D. Illustration of alanine mutation and loss of hydrophobic interactions between the MET peptide and W340, F381 and Y338 residues from caspase 3. The pictures have been generated using PyMol (DeLano Scientific). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

correct recognition of the ESVDY peptide sequence of MET by caspase 3 is unfavored, when Y1001 is phosphorylated.

We further examined the possible consequence of V999A mutation, which was found to abolish the caspase-dependent cleavage of MET. The valine residue interacts within an aromatic pocket defined by side chains of W340, F381 and Y338 of caspase 3 while the alanine mutation does not allow filling the cavity formed by these residues (Fig. 3C, D). Hydrophobic interactions between V999 and the aromatic cluster may thus be required to allow correct recognition of the ESVD sequence by the caspase 3 binding site.

Conversely, we examined the possible positioning of this MET peptide sequence within the TKB domain of CBL, using as a template the crystal structure of the TKB domain in complex with an APS 13-mer phosphopeptide fragment (PDB code: 1YVH) [29]. The phosphorylated tyrosine is deeply buried within its positively charged binding pocket, while D1000 and R1002 do not interact with CBL and lie in an opposite direction. Despite the accessibility of D1000, Y1001 is completely buried in CBL and is thus not available for further interactions with other protein partners (data not shown).

These molecular modeling studies then indicate that phosphorylation of Y1001 is not favorable for MET binding in the active site of caspase 3.

3.4. Effect of endogenous MET phosphorylation on the caspase-dependent cleavage

We then examined the possible functional interference between phosphorylation and caspase cleavage of MET. HeLa cells were treated with a specific ATP competitor of the MET kinase (SU11274) or with HGF/SF to prevent or induce MET phosphorylation, respectively, and were then treated with anisomycin to induce p40 MET generation

(Fig. 4A). The level of MET phosphorylation was assessed using a phospho-MET antibody. Generation of p40 MET by anisomycin was increased upon inhibition of MET phosphorylation by SU11274, while it was decreased upon induction of MET phosphorylation by HGF/SF. This decrease in phosphorylation by SU11274 was observed with longer exposures (data not shown). These data showed an inverse relationship between the caspase-dependent cleavage and the phosphorylation of MET.

Generation of p40 MET can be prevented by HGF/SF by a direct effect implicating MET phosphorylation, as well as by an indirect effect, as a consequence of activation of survival pathways, such as the PI3K-AKT and RAS-MEK pathways [30]. To examine whether both mechanisms contribute to protection by HGF/SF, we treated the cells with LY294002 and U0126, which are respective inhibitors of PI3K and of MEK pathways, and then cells were treated with anisomycin and/or HGF/SF to analyze p40 MET generation (Fig. 4B). Treatment of cells with LY294002 and U0126 increased caspase 3 activation, as well p40 MET generation (compare lines 1–4 and 5–8), showing that under conditions of inhibition of survival pathways, an increase of caspase 3 activation was associated with increased generation of p40 MET. Nonetheless, the fact that anisomycin could not enhance p40 MET generation any more in response to HGF/SF, while it does for active caspase 3 (lines 7–8, to be compared to lines 5–6), evidenced an additional and direct contribution of MET phosphorylation in preventing p40 MET generation.

3.5. Functional interference of Y1001 phosphorylation on the MET caspase-dependent cleavage

To directly examine the susceptibility of activated MET to caspase 3-mediated cleavage, we investigated p40 MET generation from MET receptors dephosphorylated with a phosphatase. HEK293 cells were

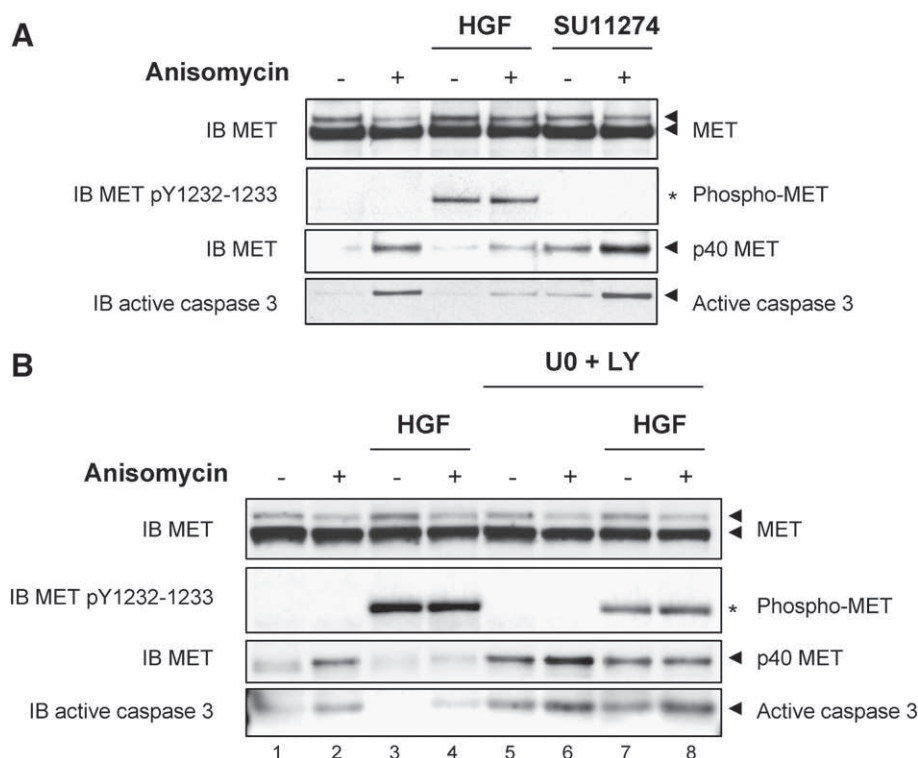


Fig. 4. Phosphorylation of endogenous MET inhibits its caspase cleavage. **A.** HeLa cells were incubated overnight in DMEM without serum and were then treated (+) or not (–) with anisomycin (50 μ M) and either with HGF/SF (50 ng/ml) or SU11274 (2.5 μ M) for 1 h, 30 min and 5 h, respectively, prior to lysis. In all cases, a proteasome inhibitor (MG101, 50 μ M) was added 2 h before cell harvesting to prevent HGF/SF induced MET down regulation. Proteins were resolved on a 4–12% NuPAGE pre-cast gel, and analyzed by immunoblotting using anti-MET antibody. The membrane was reprobed with anti-active caspase 3 antibody. Membranes were stripped and reprobed with anti-phospho Y1232–1233 MET antibody. The arrowheads indicate the positions of endogenous MET, p40 MET fragment and active caspase 3. The asterisk indicates position of phosphorylated endogenous MET. **B.** HeLa cells were incubated overnight in DMEM without serum and were then treated for 2 h or not with U0126 (U0, 10 μ M) and LY294002 (LY, 50 μ M). Next, cells were treated (+) or not (–) with anisomycin (50 μ M) and/or with HGF/SF (50 ng/ml) for 1 h and 30 min, respectively, prior lysis. As described in A, the proteasome inhibitor MG101 was added in all cases.

transiently transfected with a TRK–MET plasmid, which resulted in basal phosphorylation of the receptor, as shown by phospho–MET antibodies (Fig. 5A). The MET receptor was then immunoprecipitated from cell lysates and dephosphorylated *in vitro* by the CIP phosphatase, before its incubation with active caspase 3, for evaluating generation of p40 MET by immunoblotting. Generation of p40 MET was largely increased when caspase 3 was incubated with a dephosphorylated receptor rather than with a phosphorylated receptor (Fig. 5A). These data demonstrate that *in vitro* dephosphorylation of MET favors its caspase-dependent cleavage.

We then checked the impact of Y1001 phosphorylation itself, on the generation of p40 MET. To this purpose, we took advantage of stable MDCK cell lines, in which MET mutants are not any more constitutively phosphorylated (Fig. 5B). Wild-type and Y1001F MET cell lines were treated for 10 min before lysis with a phosphatase

inhibitor (Na_3VO_4) to increase the global level of MET phosphorylation. Cell lysates were then incubated with active caspase 3 for evaluating generation of p40 MET by immunoblotting. It should be noticed that the difference in TRK–MET migration upon caspase 3 incubation, is due to C-terminal cleavage of MET, that we previously described (Foveau et al., 2007). Indeed, C-terminal cleavage of MET removes 5 amino acids of the extreme C-terminal tail, which was visualized in these conditions of electrophoresis. Sequential cleavage of the two sites allows generation of p40 MET. As shown, in Fig. 3, generation of p40 MET was prevented from phosphorylated WT MET, but not from the Y1001F MET mutant (Fig. 5B). These data demonstrate that a non-phosphorylatable Y1001 mutant leads to enhance generation of p40 MET.

Overlapping of the sites also opens up the possibility that CBL recruitment to phosphorylated Y1001 could interfere with p40 MET

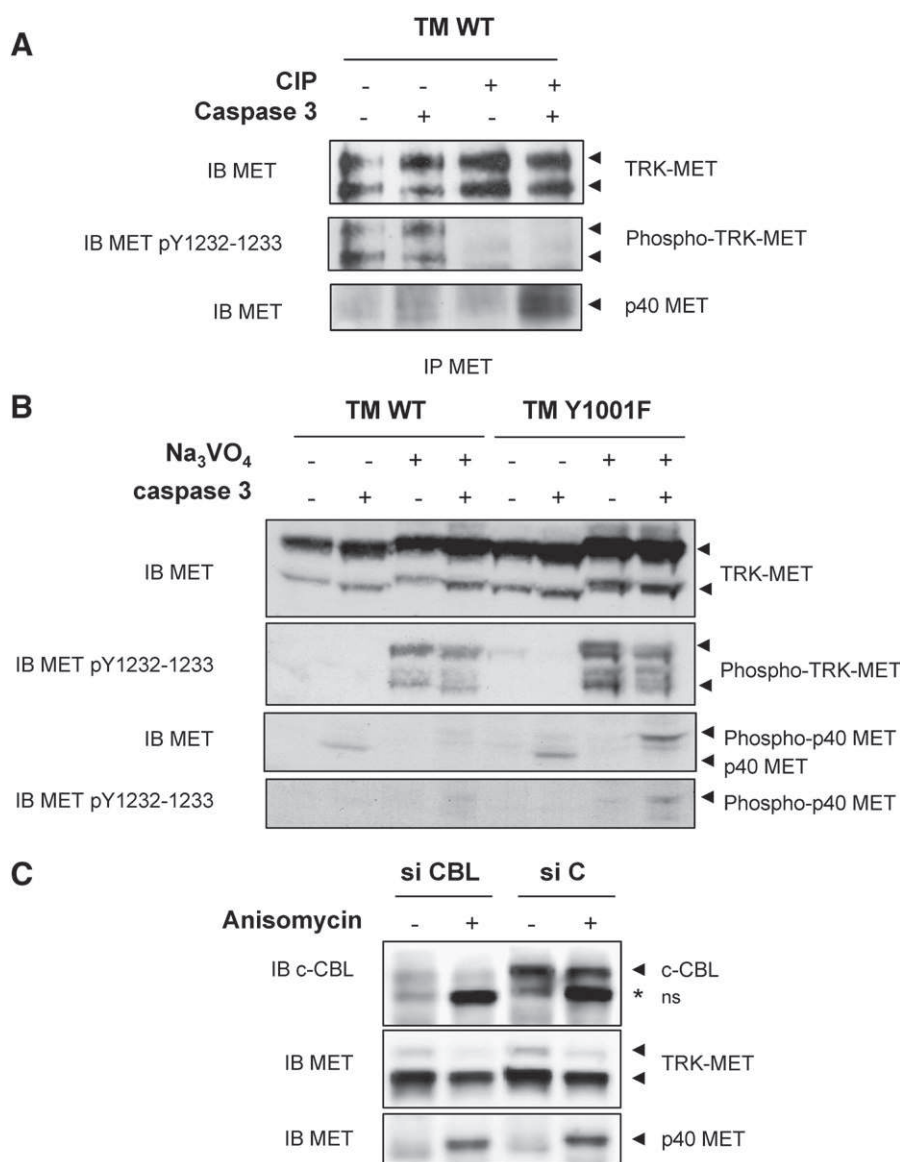


Fig. 5. Phosphorylation of the Y1001 residue inhibits caspase cleavage of MET. **A.** HEK293 cells were transiently transfected with TRK–MET WT expressing plasmid. Protein lysates were subjected to immunoprecipitation using anti–MET antibody. After washing, immunoprecipitated proteins were suspended in caspase buffer and Calf Intestine Phosphatase (CIP) was added as indicated, for 1 h at 37 °C. Then, purified active caspase 3 was added to sample for a further incubation of 4 h at 37 °C. Immunoblotting with anti–MET antibody was performed. The membrane was re-probed with anti-phosphoY1232–1233 MET antibody. **B.** MDCK stable cell lines expressing TRK–MET WT or Y1001F were treated or not with Na_3VO_4 (100 μM) for 10 min before cell lysis. Protein extracts were incubated with or without purified active caspase 3 for 4 h at 37 °C. Protein extracts were resolved by SDS–PAGE and analyzed by immunoblotting with anti–MET antibodies. The membrane was re-probed with anti-phosphoY1232–1233 MET antibody. The arrowheads indicate positions of p150 and p125 TRK–MET and position of the p40 MET fragment phosphorylated and non-phosphorylated. **C.** HeLa cells were transiently transfected with either control (siC) or c–CBL siRNA (siCBL). After 24 h, cells were co-transfected with TRK–MET WT expressing plasmid and either control or c–CBL siRNA. The following day, after 2 h of serum deprivation, cells were treated (+) or not (–) with anisomycin (50 μM) during 3 h. The asterisk indicates a stress-induced non-specific band.

Table 2
Alignment of MET juxtamembrane region in different species.

<i>Homo sapiens</i>	HLDRIVSARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGSCRQV
<i>Canis familiaris</i>	HLDRIVSARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGSCRQV
<i>Sus scrofa</i>	HLDRIVSARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGSCRQV
<i>Bos taurus</i>	HLDRIVSARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNASSQNGSCRQV
<i>Rattus norvegicus</i>	HLDRIVSARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGACRQV
<i>Mus musculus</i>	HLDRIVSARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGACRQV
<i>Gallus gallus</i>	HLDRIVSARSVSPTTEMVSNESVDYRSTFLEDQFPSSQNGSCRPA
<i>Xenopus laevis</i>	HLDRIVSARSISPTTEMVSNESVDYRSTVQEDPFPNSSQNGSCRPA
<i>Danio rerio</i>	HLDMANARSVSPTDEMVSHEVDYRTTLLDQNLPLSQTESCRPH

Accession numbers (UniProt database) for the different MET protein sequences used in this alignment are: *Homo sapiens*, P08581; *Canis familiaris*, Q75ZY9; *Sus scrofa*, Q2QLE0; *Bos taurus*, Q76915; *Rattus norvegicus*, P97523; *Mus musculus*, P16056; *Gallus gallus*, A0M8T9; *Xenopus laevis*, Q9W650; *Danio rerio*, Q64GK4.

generation. We therefore investigated generation of p40 MET under conditions of CBL inactivation. Cells were transfected with siRNA of CBL and then transfected by TRK–MET, in order to activate the MET receptor (see Fig. 2B). The loss of CBL expression was verified by immunoblotting (Fig. 5C). In these conditions, the generation of p40 MET by anisomycin was similar in the presence or absence of CBL, indicating that CBL occupation of the site containing phosphorylated Y1001 is not involved in preventing p40 MET generation. This agrees with the modeling study (see Fig. 3), which rather indicates that Y1001 phosphorylation itself, unfavors the caspase-dependent cleavage of MET.

4. Discussion

The MET tyrosine kinase receptor is targeted by caspases along apoptosis, which splits the receptor into a pro-apoptotic p40 MET fragment and a membrane-bound decoy p100 MET fragment [20–22]. The D1000 cleavage site is located in the juxtamembrane region, containing several negative regulatory sites, in particular the flanking Y1001. Here we report a direct mechanism of MET protection against caspase cleavage, by autophosphorylation of MET at the tyrosine Y1001 residue.

Caspases recognize at least four contiguous amino acids in their substrates, upstream of the cleaved C-terminal residue, which is most often an aspartic acid residue [23]. By exploring the contribution of the amino acid of ESVD¹⁰⁰⁰ sequence of MET, we determined that both valine V999 and aspartic acid D1000 are essential for caspase cleavage of MET, while glutamic acid E997 and serine 998 are not crucial. The structural modeling analysis using this MET peptide sequence confirmed the crucial role of dipeptide VD for recognition by the active site of caspase 3.

The D1000 caspase cleavage site is juxtaposed to a tyrosine Y1001 CBL recruitment site, which is involved in trafficking and turnover of the receptor [10,11,31]. We determined that the two sites overlap, but are separable using specific mutants. Indeed, a V999A mutation in MET abrogates its caspase-dependent cleavage; but not its interaction with CBL, while Y1001F mutation impairs CBL recruitment, but not its caspase-dependent cleavage. This led us to examine a possible functional interference between caspase cleavage and CBL recruitment sequences. An inverse relationship was found between generation of p40 MET and phosphorylation of MET, with a direct involvement of phosphorylated Y1001 in protecting MET against its caspase cleavage. Overlapping between the caspase cleavage site (ESVD) and the CBL recruitment motif (DYR) is conserved in every organism where MET sequence is available (29 species), from fishes to higher mammals (Table 2 and data not shown). The MET sequence of *sus scrofa* (pig) is an exception (EPVDYR instead of ESVDYR), with a mutation at a serine residue not crucial for the caspase-dependent cleavage, as demonstrated in this study. Inhibition of the caspase cleavage by a phosphorylated receptor was supported by the molecular modeling analysis, showing that recognition of the ESVDY peptide sequence of

MET by caspase 3 is not compatible when Y1001 is phosphorylated. A cartoon illustrating overlapping of the sequences and their functional relationship is shown in Fig. 6.

Among the large number of proteins that become cleaved by caspases during apoptosis, few of them are known to be directly protected by phosphorylation. Protection against caspase cleavage by phosphorylated serine residues have been shown both from in vitro studies using substrates oligopeptides [32], and from cellular studies exploring specific substrates, including Bid [33], I α B [34] and Tau [35]. The phosphorylation of tyrosine residues is less documented. The caspase cleavage of the p130cas focal adhesion protein, is attenuated by phosphorylation implicating both serine and tyrosine residues [36]. The caspase cleavage site of PKC α (D327) is at proximity of a tyrosine residue (Y332). Replacement of this tyrosine residue by a non-phosphorylatable residue led to the demonstration that its phosphorylation was necessary for the caspase cleavage, rather than preventing it, and the mechanism for this effect was not clarified [37]. The MET receptor provides the example of a direct mechanism, in which phosphorylation of a tyrosine residue flanking the caspase cleavage site, can prevent the cleavage.

In the well-established functioning of the MET receptor, its activation induces its phosphorylation and favors cell survival. In contrast, the caspase cleavage of MET, splits the receptor leading to an extracellular membrane-bound decoy fragment [20] and a cytoplasmic fragment, amplifying apoptosis [21,22]. According to our present data, we propose an original mechanism in which MET receptor activation, leading to its phosphorylation, in normal (HGF/SF binding) or pathological conditions (by overexpression or activating mutations), protects MET against its caspase-dependent cleavage. The critical balance between anti- and pro-apoptotic input of MET can therefore be controlled by the level of MET activation.

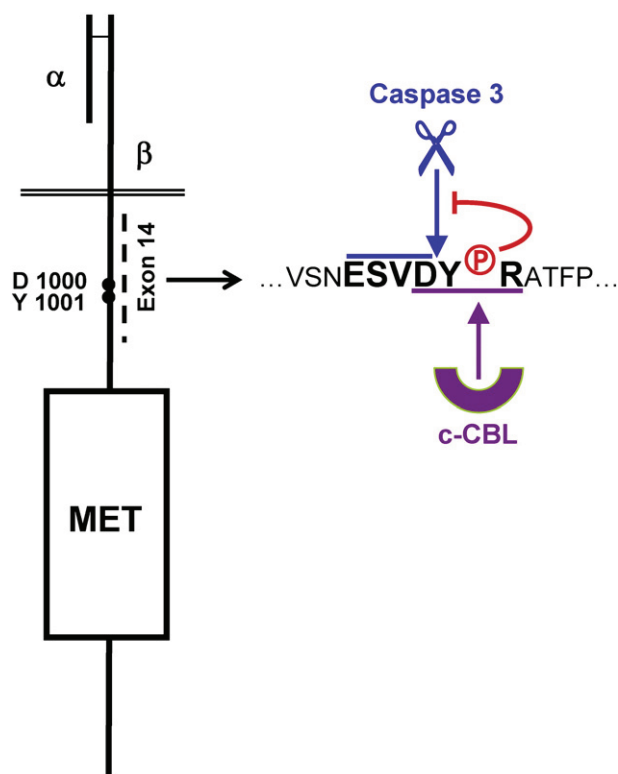


Fig. 6. Schematic representation of the juxtamembrane region of the MET tyrosine kinase receptor containing a caspase cleavage sequence (ESVD¹⁰⁰⁰) imbricated in a CBL recognition sequence (DY¹⁰⁰¹R). According to our results, upon phosphorylation of tyrosine 1001, the caspase-dependent cleavage is inhibited and CBL–TKB domain is recruited to the MET receptor.

Acknowledgements

This work was supported by CNRS, Pasteur Institute of Lille, Université Lille-Nord de France and INSERM, and by grants from Fondation de France, Ligue Régionale contre le Cancer-Comité Nord, ARC (Association pour la Recherche sur le cancer), FRM (Fondation pour la Recherche Médicale, Comité Nord Pas de Calais), Agence Nationale de la Recherche (Young Investigator Program) and Région Nord Pas de Calais FEDER. ZJ was supported by a postdoctoral fellowship from Fondation de France and JD by a fellowship from ARC.

References

- [1] C. Birchmeier, W. Birchmeier, E. Gherardi, G.F. Vande Woude, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4 (12) (2003) 915.
- [2] M. Mazzone, P.M. Comoglio, *FASEB J.* 20 (10) (2006) 1611.
- [3] F. Bladt, D. Riethmacher, S. Isenmann, A. Aguzzi, C. Birchmeier, *Nature* 376 (6543) (1995) 768.
- [4] C. Schmidt, F. Bladt, S. Goedecke, V. Brinkmann, W. Zschiesche, M. Sharpe, E. Gherardi, C. Birchmeier, *Nature* 373 (6516) (1995) 699.
- [5] Y. Uehara, O. Minowa, C. Mori, K. Shiota, J. Kuno, T. Noda, N. Kitamura, *Nature* 373 (6516) (1995) 702.
- [6] L. Schmidt, F.M. Duh, F. Chen, T. Kishida, G. Glenn, P. Choyke, S.W. Scherer, Z. Zhuang, I. Lubensky, M. Dean, R. Allikmets, A. Chidambaram, U.R. Bergerheim, J.T. Feltis, C. Casadevall, A. Zamarron, M. Bernues, S. Richard, C.J. Lips, M.M. Walther, L.C. Tsui, L. Geil, M.L. Orcutt, T. Stackhouse, B. Zbar, et al., *Nat. Genet.* 16 (1) (1997) 68.
- [7] E. Vigna, D. Gramaglia, P. Longati, A. Bardelli, P.M. Comoglio, *Oncogene* 18 (29) (1999) 4275.
- [8] M. Kong-Beltran, S. Seshagiri, J. Zha, W. Zhu, K. Bhawe, N. Mendoza, T. Holcomb, K. Pujara, J. Stinson, L. Fu, C. Severin, L. Rangell, R. Schwall, L. Amler, D. Wickramasinghe, R. Yauch, *Cancer Res.* 66 (1) (2006) 283.
- [9] L. Gandino, P. Longati, E. Medico, M. Prat, P.M. Comoglio, *J. Biol. Chem.* 269 (3) (1994) 1815.
- [10] P. Peschard, T.M. Fournier, L. Lamorte, M.A. Naujokas, H. Band, W.Y. Langdon, M. Park, *Mol. Cell* 8 (5) (2001) 995.
- [11] P. Peschard, N. Ishiyama, T. Lin, S. Lipkowitz, M. Park, *J. Biol. Chem.* 279 (28) (2004) 29565.
- [12] K.M. Weidner, M. Sachs, D. Riethmacher, W. Birchmeier, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (7) (1995) 2597.
- [13] J.H. Lee, S.U. Han, H. Cho, B. Jennings, B. Gerrard, M. Dean, L. Schmidt, B. Zbar, G.F. Vande Woude, *Oncogene* 19 (43) (2000) 4947.
- [14] P.C. Ma, T. Kijima, G. Maulik, E.A. Fox, M. Sattler, J.D. Griffin, B.E. Johnson, R. Salgia, *Cancer Res.* 63 (19) (2003) 6272.
- [15] D. Zaffaroni, M. Spinola, A. Galvan, F.S. Falvella, S. Pazzaglia, A. Saran, M.T. Mancuso, F. Galbiati, C. Pignatiello, W. Cabrera, O. Ibanez, G. Manenti, T.A. Dragani, *Oncogene* 24 (6) (2005) 1084.
- [16] J.V. Abella, P. Peschard, M.A. Naujokas, T. Lin, C. Saucier, S. Urbe, M. Park, *Mol. Cell. Biol.* 25 (21) (2005) 9632.
- [17] S. Carter, S. Urbe, M.J. Clague, *J. Biol. Chem.* 279 (51) (2004) 52835.
- [18] D.E. Hammond, S. Carter, J. McCullough, S. Urbe, G. Vande Woude, M.J. Clague, *Mol. Biol. Cell* 14 (4) (2003) 1346.
- [19] C. Ng, R.A. Jackson, J.P. Buschdorf, Q. Sun, G.R. Guy, J. Sivaraman, *EMBO J.* 27 (5) (2008) 804.
- [20] J. Deheuninck, B. Foveau, G. Goormachtigh, C. Leroy, Z. Ji, D. Tulasne, V. Fafeur, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367 (3) (2008) 573.
- [21] D. Tulasne, J. Deheuninck, F.C. Lourenco, F. Lamballe, Z. Ji, C. Leroy, E. Puchois, A. Moumen, F. Maina, P. Mehlen, V. Fafeur, *Mol. Cell. Biol.* 24 (23) (2004) 10328.
- [22] B. Foveau, C. Leroy, F. Ancot, J. Deheuninck, Z. Ji, V. Fafeur, D. Tulasne, *Cell Death Differ.* 14 (4) (2007) 752.
- [23] S.J. Riedl, Y. Shi, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5 (11) (2004) 897.
- [24] D. Tulasne, R. Paumelle, K.M. Weidner, B. Vandenbunder, V. Fafeur, *Mol. Biol. Cell* 10 (3) (1999) 551.
- [25] R. Paumelle, D. Tulasne, Z. Kherrouche, S. Plaza, C. Leroy, S. Reveneau, B. Vandenbunder, V. Fafeur, *Oncogene* 21 (15) (2002) 2309.
- [26] K.M. Weidner, G. Hartmann, L. Naldini, P.M. Comoglio, M. Sachs, C. Fonatsch, H. Rieder, W. Birchmeier, *EXS* 65 (1993) 311.
- [27] G.A. Rodrigues, M. Park, *Oncogene* 9 (7) (1994) 2019.
- [28] J.W. Becker, J. Rotonda, S.M. Soisson, R. Aspiotis, C. Bayly, S. Francoeur, M. Gallant, M. Garcia-Calvo, A. Giroux, E. Grimm, Y. Han, D. McKay, D.W. Nicholson, E. Peterson, J. Renaud, S. Roy, N. Thornberry, R. Zamboni, *J. Med. Chem.* 47 (10) (2004) 2466.
- [29] J. Hu, S.R. Hubbard, *J. Biol. Chem.* 280 (19) (2005) 18943.
- [30] G.H. Xiao, M. Jeffers, A. Bellacosa, Y. Mitsuchi, G.F. Vande Woude, J.R. Testa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (1) (2001) 247.
- [31] A. Petrelli, G.F. Gilestro, S. Lanzardo, P.M. Comoglio, N. Migone, S. Giordano, *Nature* 416 (6877) (2002) 187.
- [32] J. Tozser, P. Bagossi, G. Zahuczky, S.I. Specht, E. Majerova, T.D. Copeland, *Biochem. J.* 372 (Pt 1) (2003) 137.
- [33] S. Desagher, A. Osen-Sand, S. Montessuit, E. Magnenat, F. Vilbois, A. Hochmann, L. Journot, B. Antonsson, J.C. Martinou, *Mol. Cell* 8 (3) (2001) 601.
- [34] M. Barkett, D. Xue, H.R. Horvitz, T.D. Gilmore, *J. Biol. Chem.* 272 (47) (1997) 29419.
- [35] A.L. Guillozet-Bongaarts, M.E. Cahill, V.L. Cryns, M.R. Reynolds, R.W. Berry, L.I. Binder, *J. Neurochem.* 97 (4) (2006) 1005.
- [36] D. Hoon Kim, S. Jeon Choi, S. Kook, W. Kim, W. Keun Song, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300 (1) (2003) 141.
- [37] W. Lu, H.K. Lee, C. Xiang, S. Finniss, C. Brodie, *Cell. Signal.* 19 (10) (2007) 2165.

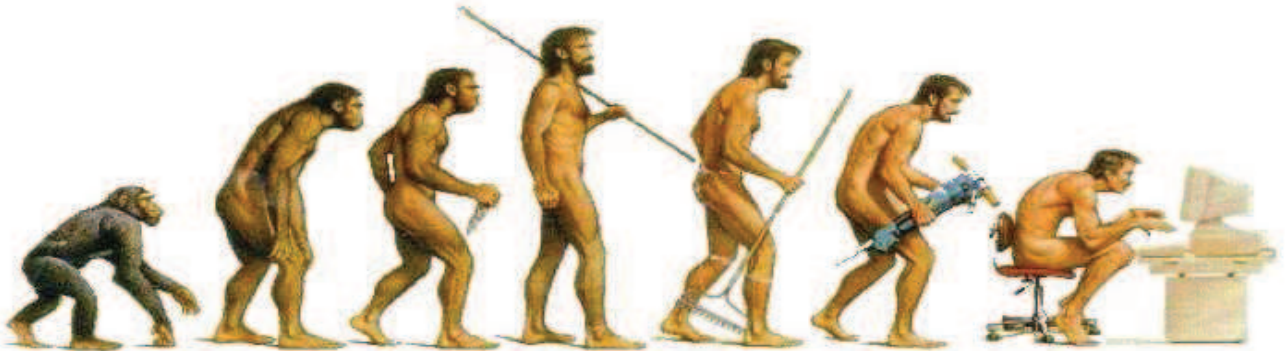
Ecole Doctorale de Biologie-Santé de Lille (EDBSL)

Université des sciences et de technologies de Lille 1 (USTL)

Valorisation des compétences : Le nouveau chapitre de la thèse

Frédéric ANCOT

Mentor : Sylvie Lots (Synergies RH Groupes)



Sujet de la thèse : Les clivages protéolytiques du récepteur tyrosine kinase Met

Directeur de la thèse : David Tulasne

Date probable de soutenance : 30/06/2010

Contexte général et enjeux

Avant la thèse...

La première vraie discussion sur mon avenir s'est faite lors de ma terminale, ma décision était déjà prise mais ma responsable de classe semblait douter de mon choix. Elle était également mon professeur de sciences de la vie et de la terre et semblait s'inquiéter du fait que je veuille m'inscrire en première année de DEUG de Sciences de la Vie. Aujourd'hui, je pense qu'elle se rendait compte de la difficulté et de l'incertitude que représente un cursus vers un poste de chercheur en France et bien que je ne regrette pas mon choix, je dois bien admettre qu'il s'agit d'une réelle aventure humaine.

Après cinq années d'étude, je suis entré en Master recherche, une période particulièrement riche, j'avais la responsabilité de mon avenir, je jugeais mes limites de travail, j'échafaudais mes premières hypothèses, en résumé, je me préparais à ma thèse. L'accomplissement de ce travail s'est soldé par l'obtention d'une bourse de trois ans du Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie.

Ma place dans le laboratoire

J'avais rencontré de nombreux chercheurs avant de trouver « mon » directeur de thèse: le docteur David Tulasne. Son enthousiasme m'avait emporté et son sujet me semblait très original. Je n'ai que très peu hésité avant de lui demander d'intégrer son laboratoire dans l'équipe IECE (Initiation et Evolution des Cancers Epithéliaux) dirigé par Véronique Fafeur et Corinne Abbadie dans l'UMR CNRS 8117.

Véronique Fafeur et David Tulasne, ainsi que deux doctorants, Julien Deheunninck et Bénédicte Foveau, une assistante ingénieur, Catherine Leroy, et moi-même constituons une équipe travaillant sur le récepteur tyrosine kinase Met. Depuis, David Tulasne est devenu le responsable de notre équipe, Julien et Bénédicte sont aujourd'hui docteurs et notre équipe s'est renforcée d'un nouveau doctorant, Jonathan Lefebvre, d'un docteur, Ghaffar Muharram et d'un ingénieur en CDD, Arnaud Lemièrre.

Enjeux scientifiques du récepteur tyrosine kinase Met

Les cellules possèdent un grand nombre de molécules qui interagissent entre elles pour le bien-être de l'organisme. Parmi ces molécules, Met est un récepteur, une protéine qui est située à la membrane de la cellule, elle a pour ainsi dire vue sur l'extérieur. Pourquoi récepteur ? Et bien, parce qu'une autre molécule, appelée Hepatocyte Growth Factor ou Scatter Factor, qui se trouve autour des cellules, est capable de se fixer au « récepteur » Met. Le complexe ainsi formé est capable de modifier l'action de la cellule : se multiplier, survivre dans des conditions toxiques, se déplacer ou encore former des réseaux selon les besoins. Le grand intérêt de l'étude de Met est qu'il peut avoir un rôle dans le développement de tumeurs. En effet, en trop grande quantité, ce récepteur entraîne une prolifération incontrôlée des cellules pouvant mener à un cancer, d'où l'intérêt d'étudier leur dégradation.

Evolution de ma thèse

Il a été montré dans notre laboratoire que le récepteur Met pouvait être coupé sur deux sites, ayant pour conséquence d'inactiver les actions décrites ci-dessus. De manière intéressante, un de ces fragments, situé dans la cellule, avait un rôle inédit et permettait d'augmenter la mort cellulaire. Mon projet a été de montrer que la première coupure, très courte (15 acides aminés), était nécessaire à la seconde et qu'il existait, lors de la mort cellulaire, une grande quantité de récepteur Met écourté par la première coupure. Ce travail s'est déroulé lors du Master Recherche et a été valorisé par une publication dans une revue internationale.

Mon projet de thèse s'est alors orienté sur les fonctions du récepteur Met écourté. A la fin de ma première année, nous avons montré que ces fonctions étaient identiques à celles observées chez les récepteurs normaux. Il était alors nécessaire de changer notre fusil d'épaule et de nous attaquer à un autre projet, le clivage PS-RIP de Met.

Qu'est-ce que le PS-RIP (ou PreSenilin-Regulated Intramembrane Proteolysis)? Il s'agit d'une dégradation du récepteur Met par une double coupure qui se déroule de manière basale, cela signifie que ce mécanisme a lieu de façon continue. Mon changement d'orientation scientifique et la finition de l'article consacré à ce clivage PS-RIP de Met m'ont pris une année mais ils m'ont permis d'être deuxième auteur sur ce travail.

Lors de ma troisième année, j'ai travaillé sur la résistance de cellules dans lesquelles le récepteur Met n'est pas dégradé. Dans ce contexte, l'utilisation de drogues anti-tumorales est moins efficace. Mon projet a donc été d'étudier les raisons de cette résistance et le rôle du mécanisme de PS-RIP dans des fonctions pro-tumorales.

Gestion du projet

Orientation

L'année de Master recherche m'a permis de construire les outils nécessaires à l'étude des coupures du récepteur Met lors de la mort des cellules. Le projet a rapidement été mis en place au début de ma thèse, les résultats se sont révélés ambigus et il a fallu un certains temps avant de s'assurer des réponses obtenues. Comme le clivage du récepteur ne semblait pas modifier l'action de Met dans notre modèle, nous avons choisi, à la fin de la première année, de nous consacrer au mécanisme du PS-RIP. Il m'a fallu m'adapter à ce nouveau projet, à m'approprier de nouvelles données bibliographiques ainsi qu'à des manipulations différentes. Une fois l'article consacré à la découverte du PS-RIP terminé, j'ai continué d'étudier ce mécanisme en m'appuyant sur les résistances aux drogues durant ma troisième année.

Conduite

Les entretiens avec mon tuteur ont lieu environ toutes les deux semaines, nous parlons des résultats obtenus et des modifications à apporter. A chaque idée ou résultat intéressant, nous interagissons rapidement afin de réorienter notre action. Il y a également une réunion d'équipe par semaine où un collègue présente ses résultats, je présente donc mes travaux à l'ensemble du groupe environ tous les trois mois.

Nous avons également discuté de mon orientation à des moments clés de ma thèse : lorsque j'ai changé de thématique, après un problème de santé qui avait nécessité une période d'arrêt et lors du choix de demander une quatrième année de thèse pour terminer mon projet. Chacune de ces discussions m'a permis d'avancer et d'affiner mes projets.

Partenaire

Les publications de nos travaux et nos revues nous ont permis de se faire connaître du monde scientifique mais également du monde de l'entreprise. En effet, nous sommes en collaboration avec l'équipe de Silvia Giordano (IRCC, Turin) qui travaille également sur Met. Ils ont montré que des anticorps dirigés contre Met dégradent le récepteur et nous avons prouvé que

ce rôle est dû au PS-RIP; notre collaboration a ainsi permis de publier un article scientifique de qualité.

Plus proche de nous, à l'Institut de Biologie de Lille, je collabore activement avec un biochimiste, Alexandre Barras, qui élabore des produits de synthèse visant à inhiber mais également à dégrader le récepteur Met. Cette double capacité permettrait d'augmenter fortement l'efficacité de drogues anti-tumorales.

Propriétés intellectuelles

La collaboration avec des entreprises nous permet de débloquent des moyens supplémentaires et d'initier des interactions très enrichissantes. En contrepartie, il nous a été demandé de respecter un accord de confidentialité sur le nom de l'entreprise ou sur les travaux menés, ce qui peut compromettre la publication de résultats d'ordre académique. Il est donc important de bien réfléchir avant de s'associer à une entreprise sous peine de s'éloigner des objectifs premiers d'un laboratoire de recherche fondamentale.

Coût du projet

Ma thèse a été financée par le ministère national de l'éducation et de la recherche pendant trois ans, ce qui représente un investissement conséquent auquel il faut ajouter le temps pris par les personnes m'ayant encadré. Je ne compte pas les nombreux conseils et l'aide que j'ai reçue tout au long de ces trois ans. Il faut également prendre en compte les fournitures, le coût de l'infrastructure de l'IBL et les frais de formation fournis par l'école doctorale. J'ai recueilli dans un tableau en annexe le détail du coût de ma thèse.

J'ai choisi de ne pas tenir compte du monitorat, bien qu'il fasse partie intégrante de ma formation, car il s'agit d'un travail indépendant de ma thèse. Je ne peux pas nier que le monitorat a eu un impact important sur mon travail de recherche mais son coût relève de service à part entière au niveau du ministère de la recherche et également du CIES (Centre d'Initiation à l'Enseignement Supérieur) qui gère les frais de ma formation.

Impact de ma thèse

Ma thèse a coûté 142 730 euros à l'état et aux diverses organisations caritatives qui subventionnent mon équipe. Dans l'immédiat, cet investissement a permis de publier un article sur l'existence d'une nouvelle voie de dégradation de Met. Cette publication dans une revue internationale valorise un travail effectué dans la métropole lilloise et prouve le dynamisme de notre laboratoire. Mon directeur a donc pu mettre en avant nos travaux dans des demandes de financement à des associations comme l'Association de Recherche sur le Cancer et la Fondation pour la Recherche Médicale. Les travaux menés servent à améliorer les connaissances sur la dégradation du récepteur Met et les résistances des cellules à des outils pharmacologiques. A terme, nous pourrions améliorer l'efficacité des chimiothérapies en les ajustant selon le type de tumeur et le rôle du récepteur Met.

Durant ces trois années, notre laboratoire a su se faire connaître par les grands laboratoires qui étudient le récepteur tyrosine kinase Met. Ainsi, notre visibilité s'en est trouvée augmentée, apportant de nouvelles collaborations et suscitant l'intérêt d'un groupe pharmaceutique qui subventionne un ingénieur et des fournitures pour un an.

En parallèle, les résultats prometteurs obtenus avec Alexandre Barras intéressent de nombreuses entreprises. S'il est prouvé que les produits élaborés sont efficaces sur les cellules tumorales, les retombées seraient conséquentes. En effet, il s'agirait d'un nouvel outil qui s'adapterait à beaucoup de cancers, un outil de plus, mais non des moindres, dans le panel de traitements anti-tumoraux.

Sur le long terme et d'un point de vue plus personnel, l'investissement dont je fais l'objet devrait porter ses fruits. Le groupe que j'intégrerai profitera de mon expérience et m'offrira un terrain apte à mon épanouissement. Les différentes compétences que je me suis découvertes durant ma thèse continueront de se développer, me permettront d'élaborer de nouveaux projets et assureront à ma nouvelle équipe un retour sur investissement des plus appréciables.

Valorisation des compétences

Compétences scientifiques

Au début, il n'y avait rien, à part peut-être une curiosité scientifique et un grand attrait pour la recherche. Il aura fallu un échec aux examens pour renouer avec le travail et revenir avec une motivation nouvelle pour accéder au Master recherche. Ce fut une année dense qui a placé en moi les germes de nombreuses compétences que ma thèse a permis de faire croître.

L'ensemble de mes recherches ont toujours eu Met comme centre d'intérêt. A chaque nouvelle hypothèse, à chaque nouveau projet, j'ai découvert de nouvelles facettes de ce récepteur et autant de connaissances nouvelles à intégrer. Lors de mes recherches, j'ai accédé à de plus en plus de techniques, comme la culture des cellules et l'étude de leurs phénotypes, l'utilisation de Western-blot et de ses révélations (au propre comme au figuré), l'utilisation d'immunofluorescence et des microscopes ou encore de la cytométrie de flux. Ces deux derniers types d'appareil ont notamment nécessité l'acquisition de connaissances et de savoir faire qui ont enrichi mon champ de compétences au sein du laboratoire.

Le monitorat

Ma thèse fut également l'occasion de faire un monitorat. Ainsi, j'ai enseigné dans des domaines éloignés de mon sujet notamment l'embryologie, l'étude de la dynamique des tissus cellulaires et de stratégies expérimentales au cours de travaux dirigés et de travaux pratiques en première et troisième année de licence. L'expérience fut des plus intéressantes et je me suis découvert une aisance, une autorité ainsi que des capacités de pédagogue durant mes enseignements.

Qualités personnelles

La recherche et l'enseignement ont révélé que la prise d'autonomie et l'organisation étaient des points que je devais absolument travailler. Au cours de mes trois années de thèse, j'ai peu à peu pris des habitudes de travail pour fluidifier et planifier mes activités, des efforts qui sont encore indispensables de maintenir. Dans ces tâches, j'ai heureusement toujours pu recevoir de l'aide de mon tuteur ainsi que des personnes qui m'entourent, collègues et amis, et j'ai plaisir à donner à mon tour ces enseignements aux personnes qui en ont besoin.

Cet altruisme a toujours été dans mon caractère, et bien que le stress éprouvant du travail de recherche puisse amoindrir cette capacité, il est important de conserver ce trait de caractère qui permet de faciliter le travail d'équipe. En effet, si les connaissances acquises sur le récepteur Met sont importantes, elles ne serviront que très peu quand je serai amené à étudier un nouveau sujet. Par contre, la motivation dont j'ai pu faire preuve, ma curiosité scientifique, mes capacités à échauffer des hypothèses originales et à monter un projet, mon sens de la pédagogie et du bien commun seront les clefs qui m'assureront une grande adaptabilité au sein d'une équipe, qu'elle soit publique ou privée, basée sur de la recherche fondamentale ou appliquée.

Stratégie pour l'emploi

La thèse a mis à jour de nouvelles capacités que j'entends bien continuer d'utiliser dans la filière de la biologie cellulaire. Cela laisse néanmoins un très large éventail de possibilités et il m'est nécessaire de ne choisir que quelques axes de travail. Parmi les différentes voies possibles, j'ai toujours une affection particulière pour les stratégies anti-tumorales mais également dans le vieillissement et l'étude des cellules souches. De plus, je souhaite continuer à jouer un rôle dans la recherche et notamment pouvoir diriger une équipe. C'est pourquoi, il m'est indispensable de partir en post-doctorat à l'étranger. Je compléterai ainsi ma formation par l'accession à une autonomie complète, à la gestion d'un budget et à une maîtrise de l'anglais.

Avec ces atouts en main, je pourrai alors me lancer sur le marché du travail. Les trois voies que j'ai citées ci-dessus ne sont pas anodines, il s'agit là de marché porteur que ce soit l'élaboration d'outils anti-tumoraux ou de recherche contre le vieillissement. Je souhaite m'intégrer au sein d'une équipe de recherche et de développement dans une grande entreprise qui permettrait de financer mes études ainsi que l'équipe dont j'aurais la responsabilité. La situation géographique importe peu, seules comptent les structures mises à ma disposition et les collaborations auxquelles j'aurai accès.

Ne nous leurrons pas, ce parcours est semé d'embûches et ma seule motivation ne pourrait être un laisser-passer suffisant. Il est donc primordial de garder un esprit d'initiative, une envie intacte de continuer à évoluer et de multiplier mes contacts qui sont une garantie de la réussite de ce projet.

Pour conclure, j'ai le sentiment que la thèse est un lance-pierre (un lance-pierre particulièrement onéreux certes) qui permet aux étudiants de se propulser dans des territoires qui restent à exploiter. Charge à nous de profiter de cette impulsion pour rebondir toujours plus haut, afin que les institutions qui ont eu confiance en nous ne regrettent pas leur choix et continuent de donner leur chance à tous ces jeunes gens qui croient dans la recherche

Annexe 1 : coût de la thèse

<u>Ressources humaines</u> - Doctorant à temps plein - Directeur de thèse (10% du temps) - Assistante ingénieure du laboratoire (2% du temps) - Technicienne de cytométrie de flux (2% du temps sur un an)	83575,80 10140,48 1549,41 452,48
<u>Consommables</u> - Fournitures expérimentales (plastiques, milieu de culture, bactériologie, anticorps, siRNA, oligonucléotides) - Fournitures de bureaux	30475,49 50
<u>Coûts infractructures</u> - Bâtiments, entretien, électricité, téléphone, eau	5000
<u>Matériel (amortissement)</u> - 2 PSM : 14612,99 € ; 10 personnes ; 15 ans - 3 étuves : 30600 € ; 10 personnes ; 15 ans - Révélateur : 45 000 € ; 25 personnes 10 ans - Microscope inversée et acquisition photographique : 13326,25 € ; 10 personnes; 20 ans - Apotome : 15 000 € ; 20 personnes; 10 ans - Cytomètre de flux : 20 000 € ; 20 personnes ; 10 ans - Spectrophotomètre : 10 000 € ; 25personnes ; 15 ans - 2 centrifugeuses (petites) : 7750 € ; 20 personnes ; 10 ans - Centrifugeuse (grande) : 7809 € ; 15 personnes ; 10 ans - Ordinateur : 900€ ; 1 personne ; 3 ans - Logiciel de bureau (microsoft office, endnote, Acrobat reader, photoshop) - Minispin : 950 € ; 4 personnes ; 20 ans - Azote : 4229 € × 2 ; 20 personnes ; 30 ans - Imprimante : 1570 € ; 20 personnes ; 10 ans - Réfrigérateur -20 : 1277 € ; 5 personnes ; 15 ans 4° : 1000 € ; 5personnes ; 15 ans × 2 -80 : 6400 € ; 20 personnes ; 20 ans - Cuve Transfert : 765 € et support 1015 € × 2 ; 5personnes ; 5 ans	350 732 646 239 75 100 96 135 187 1076 502 43 25 28 61 96 57 335
<u>Maintenance des appareils:</u> - 60 000 € ; 40 personnes	1500
<u>Frais de déplacement</u> - Congrès : apoptosis World, 2008, Luxembourg (inscription, hôtel, restauration)	1200
<u>Frais de formation</u> - Doctoriales 2008 - NCT 2009	1000 500
<u>TOTAL</u>	142 730, 66

Annexe 2 : Curriculum Vitae

Frédéric Ancot
Né le 13/02/1982, nationalité française
242, rue du faubourg de Roubaix, appartement 128
59800 Lille, France
06.13.67.41.15, frederic.ancot@gmail.com

Doctorant en biologie cellulaire

Formation	<i>Depuis 2006</i> Préparation du doctorat <u>Directeur de thèse</u> : <i>Dr David Tulasne</i> <u>Sujet</u> : dégradation du récepteur Met par clivages protéolytiques <i>2005-2006</i> Master 2 recherche biologie-Santé Mention bien université de Lille I-II <i>2004-2005</i> Master 1 en biologie et biotechnologie option biologie cellulaire Mention bien université de Lille I <i>2003-2004</i> Maîtrise de Génétique et Microbiologie <i>2002-2003</i> Licence de biologie cellulaire <i>1999-2000</i> Baccalauréat Série S Lycée Notre Dame de la Paix, Lille
Stages et expériences professionnelles	<i>2005-2006</i> Stage de Master Biologie Santé dans l'UMR 8161 à l'IBL, équipe du <i>Dr David Tulasne</i> <u>Sujet</u> : Clivage du récepteur tyrosine kinase Met <i>Février à juin 2004</i> Stage dans l'unité INSERM 508, équipe du <i>Dr Aline Meiraghe-hurez</i> <u>Sujet</u> : Polymorphisme de la périlipine dans la population française <i>Juillet 2003</i> Stage dans l'unité INSERM 459, équipe du <i>Dr Thierry Idziorek</i> <u>Sujet</u> : Extraction de cellules épithéliales
Enseignement	<u>Monitorat</u> : Travaux dirigés et travaux pratiques d'embryologie et de stratégies expérimentales en Licence de Biologie à l'Université des Sciences et de Technologies de Lille
Compétences	<u>Techniques</u> : Maîtrise de western-blot et de réponses biologiques <i>in vitro</i>, Utilisation de microscopes photoniques (apotome et confocal) et de cytomètres en flux <u>Humaines</u> : veille technologique, autonomie, esprit d'équipe
Divers	<u>Anglais</u> : Lu, écrit, parlé Titulaire du brevet de secourisme et du permis B