

Université des Sciences et Technologies de Lille
Institut de Biologie de Lille, CNRS UMR 8161
Institut Pasteur Lille
Région Nord-Pas-de-Calais
Ecole Doctorale Biologie-Santé

Thèse de doctorat

Préparée par

Rémi MONTAGNE

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

EFFETS DES CLIVAGES DU RECEPTEUR TYROSINE KINASE MET PAR LES CALPAINES SUR LA MOTILITE ET LA MORT CELLULAIRE

Soutenue le 17 Décembre 2014

Devant le jury composé de :

Président :	Pr Tony LEFEBVRE
Rapporteurs :	Dr Véronique ORIAN-ROUSSEAU Dr Philippe JUIN
Examineurs :	Pr Yvan DELAUNOIT Dr Servane TAUSZIG-DELAMASURE
Directeur de thèse :	Dr David TULASNE

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci aux docteurs Véronique Orian-Rousseau et Philippe Juin d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. Merci au professeur Tony Lefebvre d'avoir accepté de présider mon jury et merci au docteur Servane Tauszig-Delamasure et au professeur Yvan de Launoit d'être mes examinateurs.

Je remercie la Région Nord-Pas-de-Calais et l'Institut Pasteur de Lille d'avoir financé ces trois années de thèse.

Je remercie Yvan de Launoit de m'avoir accueilli au sein de l'UMR8161.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, le Dr David Tulasne, à l'enthousiasme débordant et à l'énergie intarissable. Ces années à tes côtés ont été riches en expériences et en enseignements, sur le plan scientifique comme humain. Merci pour ta présence et ton soutien.

Je remercie bien sûr l'ensemble des membres de l'équipe « Signal » pour leurs conseils et leur aide tout au long de cette thèse : Fabrice Lejeune, Zoulika Kherrouche, Alessandro Furlan, Alexis Cortot et Marie-Christine Copin : cela a été un plaisir de vous côtoyer. Et merci, Alexis, pour l'aide que tu continues à m'apporter. Merci à Catherine Leroy pour son encadrement rigoureux. Un énorme merci à Nadège Debreuck, Mélanie Berbon et Sarah Mekki pour leur aide et leur bonne humeur au quotidien. Merci pour votre soutien et votre disponibilité, vous m'avez aidé à prendre du recul quand j'en avais besoin. Et plein de courage pour la dernière ligne droite de ta thèse, Sarah, qui n'aura pas été de tout repos. Surtout continue d'organiser les soirées restaurant, qui permettent de décompresser tous ensemble. Merci à Jieshuang Jia, dont la force de travail et l'optimisme ne cessent de m'impressionner.

Je souhaite aussi beaucoup de courage à la relève : les thésards Simon Baldacci et Hana Benhabiles ainsi que notre nouvelle Master 2, Leslie Duplaquet. Vous avez de très beaux projets devant vous et je vous souhaite beaucoup de réussite.

Un bonjour aux anciens, notamment Arnaud Lemièrre qui a travaillé sur le projet « p45 Met » avant mon arrivée et Jonathan Lefebvre qui a su trouver un peu de temps pour moi pendant son post-doctorat à l'autre bout de la France. Et bien sûr Ane Baranzelli et Diane Panier, avec qui nous avons passé une année « canon-laser ».

Je remercie aussi les autres membres de l'UMR8161 pour tous les bons moments passés ensemble, la bonne humeur et les petits coups de pouces. Plus particulièrement merci à Joe Nassour de m'avoir écouté et supporté si souvent. Sincèrement, tu mérites ton auréole. Et de très, très beaux papiers ! Ainsi que Racha Dernayka, qui va devoir accueillir un nouveau voisin de bureau.

Je remercie aussi Geoffrey Le Coz, le meilleur des amis, Blanche Sénicourt, au pays des caribous et Anne Chebel, son hippocampe, ses Margaritas...

Et bien sûr un grand merci à toute ma famille qui m'a toujours soutenu, supporté et plus encore. Plus particulièrement ma mère et mon petit frère, Nicolas. Merci pour votre patience et votre présence.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	4
RESUME.....	7
ABSTRACT	8
TABLE DES FIGURES	9
TABLE DES ABBREVIATIONS.....	10
INTRODUCTION.....	12
I. Le récepteur Met et son ligand.....	13
A) La découverte du couple HGF/SF-Met	13
B) Activation du récepteur Met par l'HGF/SF	14
1) L'HGF/SF	14
2) Le récepteur Met	15
3) La liaison de l'HGF/SF à Met.....	16
II. Rôles physiologiques et signalisation du couple HGF/SF-Met.....	18
A) Les nombreux rôles physiologiques du couple HGF/SF-Met	18
1) Des facteurs pléiotropiques <i>in vitro</i>	18
2) Implication du couple HGF/SF-Met dans le développement embryonnaire..	19
3) Implication du couple HGF/SF-Met dans l'homéostasie épithéliale chez l'adulte.....	22
B) La signalisation du couple HGF/SF-Met	23
1) Les cascades de signalisation en aval du récepteur Met	24
a. Recrutement des partenaires de Met : le rôle fondamental de GAB1	24
b. GRB2 et les MAPKinases	25
c. La voie PI3Kinase/Akt.....	26
d. Les voies de signalisation associées à l'internalisation de Met	26
e. Un réseau de signalisation complexe.....	27
2) Rôle des partenaires membranaires : le réseau social de Met.....	28
a. CD44	28
b. Les intégrines	30
c. Les plexines et les sémaphorines	31
d. Le récepteur FAS : un rôle pro-apoptotique pour l'HGF/SF	32
3) L'arrêt de la signalisation de Met	32
a. La phosphorylation de la Sérine S985	33
b. La dégradation de Met dépendante du ligand	33
c. La dégradation de Met par des protéines contenant des régions riches en résidus Leucine	35
d. La dégradation de Met par clivage protéolytique.....	35
III. Le couple HGF/SF-Met dans le cancer.....	36
A) De puissants oncogènes	37
1) Mécanismes de dérégulation : le couple HGF/SF-Met perd le contrôle.....	37
a. Mutations de la séquence de Met	37
b. Surexpression de Met.....	40

c.	Surexpression de l'HGF/SF : autocrine et paracrine	43
d.	Notion d'addiction à Met	44
e.	Interaction avec d'autres récepteurs tyrosine kinase.....	45
2)	Implication du couple HGF/SF-Met dans les métastases.....	46
3)	Implication du couple HGF/SF-Met dans les résistances aux thérapies ciblées actuelles	47
a.	Activation autonome de Met au sein des cellules cancéreuses.....	47
b.	Activation de Met par le stroma.....	48
B)	HGF/SF et Met, des cibles thérapeutiques	49
1)	Les inhibiteurs de l'activité kinase de Met.....	50
2)	Les anticorps monoclonaux.....	51
3)	Les antagonistes de Met et les leurres au ligand	55
a.	Les antagonistes de Met.....	55
b.	Les leurres au ligand	56
4)	L'émergence de résistances aux thérapies ciblant le récepteur.....	56
5)	Perspectives.....	57
a.	Cibler des cancers moins avancés	58
b.	Identifier de nouveaux marqueurs de réponse aux traitements.....	58
c.	Identifier des mécanismes de résistance innée.....	60
d.	Optimiser les protocoles	60
e.	Augmenter le nombre de cibles	61
IV.	Modifications de l'activité du récepteur Met par clivage protéolytique.....	61
A)	PS-RIP	61
B)	Les caspases	63
1)	L'apoptose.....	63
2)	Clivages caspases et récepteurs à dépendance.....	66
3)	La conversion pro-apoptotique de Met	68
C)	Mutations juxtamembranaires et clivages protéolytiques : à la recherche d'un lien	69
V.	Calpaïnes, cancer, et mort cellulaire.....	70
A)	Des protéases cytoplasmiques dépendantes du calcium	71
B)	Implication des calpaïnes dans le cancer	75
1)	Calpaïnes, migration et invasion cellulaire.....	77
a.	Les calpaïnes gouvernent la dynamique des points focaux d'adhésion ..	77
b.	Les calpaïnes favorisent l'invasion	78
2)	Calpaïnes et angiogenèse	79
C)	Calpaïnes, survie et mort cellulaire : un rôle ambivalent.....	79
1)	Les calpaïnes favorisent la mort cellulaire	80
2)	Les calpaïnes relaient des signaux pro-apoptotiques	80
a.	L'apoptose dépendante des caspases	80
b.	L'apoptose indépendante des caspases	82
3)	Les calpaïnes inhibent l'autophagie et orientent les cellules vers l'apoptose.....	83
4)	... ou induisent l'autophagie et protègent les cellules contre l'apoptose	84
5)	Les calpaïnes sont impliquées dans la nécrose.....	85
a.	De nombreux stimuli induisent la nécrose.....	86
b.	La perméabilisation mitochondriale renforce les signaux pro-nécrotiques.....	87
c.	Les calpaïnes comme effecteurs de la nécrose	88
d.	Importance relative des calpaïnes dans la nécrose	90
e.	La nécrose médiée par les calpaïnes dans le cancer	91

RESULTATS	93
I. La mutation R970C induit un clivage aberrant du récepteur Met	94
A) Résumé de la publication 1 et étude du clivage de Met en p45 Met induit par la mutation R970C	94
B) Expériences complémentaires : identification d'une zone de clivage complémentaire.....	124
II. Dégradation de Met suite à un fort stress calcique	125
DISCUSSION	153
I. La génération d'un fragment amplificateur de la motilité cellulaire	155
A) p45 Met est généré dans des conditions associées à la tumorigenèse	155
1) La mutation R970C et la densité cellulaire.....	155
2) Rôle des facteurs de croissance HGF/SF et EGF.....	157
B) Vers la caractérisation du fragment p45 Met	159
C) p45 Met présente une localisation nucléaire et pourrait jouer un rôle de facteur de transcription	160
1) p45 Met présente une localisation nucléaire	160
2) p45 Met est-il un (co)-facteur de transcription ?.....	161
D) p45 Met augmente la motilité cellulaire.....	162
1) p45 Met amplifie la dispersion et la motilité en réponse au ligand	162
2) Des résultats à valider dans d'autres lignées	163
3) Le récepteur est impliqué dans d'autres phénotypes ?.....	164
II. Le récepteur Met est efficacement dégradé lors de la nécrose induite par stress calcique	165
A) L'induction de la nécrose induite par un stress calcique	165
1) Les ionophores du calcium induisent une mort cellulaire de type nécrotique	165
2) Le récepteur Met, un facteur de survie face à la nécrose	166
B) Les calpaïnes dégradent Met en un fragment p40 Met calpaïnes.....	167
C) Identification du site de clivage par spectrométrie de masse	168
D) La p40 Met calpaïne présente une faible cytotoxicité	168
E) Les métalloprotéases membranaires sont les principaux acteurs de la dégradation de Met	169
1) Les ionophores du calcium favorisent l'élagage de Met.....	169
2) Importance de l'élagage de Met pour sa dégradation et son inactivation durant la nécrose induite par le calcium.....	170
3) Le fragment Met-NTF est-il un leurre au ligand ?.....	171
III. Le récepteur Met est clivé dans des tumeurs pulmonaires	172
A) La détection de fragments de Met dans les tumeurs surexprimant Met	172
B) p45 Met, un acteur de la tumorigenèse ?.....	174
C) p40 Met calpaïne, un fragment cytotoxique ?	175
D) Un rôle supresseur de tumeur pour Met-NTF ?	175
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	178
ANNEXES	202

RESUME

L'activation du récepteur tyrosine kinase Met par son ligand, l'Hépatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF), induit de nombreuses réponses cellulaires telles que la survie, la prolifération ou la migration. Alors que le récepteur Met est nécessaire pour le développement embryonnaire, une dérégulation de sa signalisation favorise la tumorigenèse et la survenue de métastases.

Mon laboratoire a précédemment démontré que le récepteur Met subit de nombreux clivages protéolytiques, qui régulent son activité. En effet, il est la cible de la « PreSenilin-dependent Regulated Intramembrane Proteolysis » (ou PS-RIP), un double clivage par des métalloprotéases membranaires de la famille ADAM puis par le complexe γ -sécrétase. Le PS-RIP est impliqué dans la dégradation du récepteur et le contrôle de sa demi-vie. Suite à un stress apoptotique, Met est également clivé par les caspases, qui génèrent alors un fragment intracellulaire amplificateur d'apoptose d'environ 40kDa, p40 Met caspase.

J'ai pu démontrer que le récepteur Met est également la cible d'une autre famille de protéases, les calpaïnes. Les calpaïnes réalisent deux clivages distincts du récepteur Met, chacun lié à un contexte cellulaire bien spécifique. En effet, la présence d'une mutation juxtamembranaire (R970) observée dans certains cancers ou une forte densité cellulaire induisent le clivage de Met en un fragment p45 Met. Le p45 Met se relocalise dans le noyau et augmente la capacité des cellules à se disperser ainsi que leur motilité, suggérant un rôle dans la transformation cellulaire.

A la suite d'un fort stress calcique induisant la mort des cellules par nécrose, le récepteur Met est par contre clivé en un fragment d'environ 40kDa. Contrairement au fragment p40 Met caspase, ce fragment p40 Met calpaïne ne semble pas cytotoxique et son éventuel rôle biologique reste à démontrer. Durant cette mort par nécrose, le récepteur est également clivé par les métalloprotéases membranaires. Ces deux clivages simultanés permettent la dégradation efficace d'un facteur de survie important pour de nombreuses cellules.

De manière intéressante, l'ensemble de ces fragments est fortement détecté dans des tumeurs pulmonaires sur-exprimant Met. Ces résultats démontrent que les clivages identifiés par notre laboratoire *in vitro* reflètent des mécanismes existant dans des conditions pathologiques. Ils suggèrent que l'accumulation de Met dans les cellules cancéreuses advient suite à la saturation des différentes voies de dégradation existantes. Le rôle biologique *in vivo* de ces fragments, notamment le p45 Met et le p40 Met calpaïne, restent à préciser.

ABSTRACT

Upon activation by its ligand Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF), Met receptor induces survival, proliferation or migration. While necessary for embryo development, a deregulation is involved in various cancers and in metastasis.

My lab previously showed that Met receptor activity is regulated by various proteolytic cleavages. Indeed, it is targeted by PreSenilin-Dependent Regulated Intramembrane proteolysis (PS-RIP), two sequential cleavages mediated by ADAM family metalloproteases then the γ -secretase complex. PS-RIP is involved in Met degradation and thus controls its half-life. Following an apoptotic stress, Met is also cleaved by caspases, generating a fragment about 40kDa, p40 Met caspase, which amplifies apoptosis.

I showed that Met is also targeted by another protease family, calpains. Calpains mediate two different cleavages of Met in two distinct contexts. Indeed, the R970C mutation or high cell density induces cleavage of Met into p45 Met. This fragment translocates in the nucleus and favors cell scattering and motility, suggesting it is involved in cell transformation.

On the other hand, during a strong calcium stress inducing necrosis of the cells, Met receptor is cleaved into a fragment about 40kDa. Unlike p40 Met caspase, this fragment, p40 Met calpain, doesn't seem to increase apoptosis and its potential biological properties have not been shown so far. During this calcium stress induced necrosis, Met is also cleaved by membrane metalloproteases. These two simultaneous cleavages achieve efficient degradation of this important survival factor.

Interestingly, these fragments are detected in lung cancer samples overexpressing Met. These results indicate that the proteolytic cleavages of Met that we characterized *in vitro* have a pathological relevance. They suggest that Met receptor accumulation in cancer cells results from saturation of its various degradation pathways. *In vivo* functional consequences of these fragments, more especially p45 Met and p40 Met, are still to be elucidated more accurately.

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Domaines et structure tridimensionnelle de l'HGF/SF	14
Figure 2 : Domaines et structure tridimensionnelle du récepteur Met	16
Figure 3 : Modélisation de l'interaction entre HGF/SF et Met.....	17
Figure 4 : Phénotypes de souris KO pour l'HGF/SF ou Met.....	20
Figure 5 : Effets de l'inactivation ou de l'extinction conditionnelle de Met sur l'innervation des structures musculaires	21
Figure 6 : Partenaires protéiques recrutés et réponses biologiques induites par le récepteur Met activé	28
Figure 7 : Les partenaires membranaires de Met	32
Figure 8 : Rôles de l'internalisation du récepteur Met : recyclage, signalisation et dégradation	34
Figure 9 : Propriétés des tumeurs.....	37
Figure 10 : Mutations de Met identifiées chez l'homme	39
Figure 11 : Implication du couple HGF/SF dans différents cancers.....	40
Figure 12 : Intensité de l'expression de Met dans des cancers pulmonaires.....	41
Figure 13 : Détection d'une amplification génique de Met par FISH.....	45
Figure 14 : Stratégies d'inhibition du couple HGF/SF-Met dans les cancers.....	49
Figure 15 : Principaux inhibiteurs de Met actuellement en phase d'essai clinique	54
Figure 16 : Clivages protéolytiques et mutations juxtamembranaires du récepteur Met.....	70
Figure 17 : Domaines et structure tridimensionnelle de la calpaïne 2 dimérisée à la calpaïne-S1	72
Figure 18 : Acides aminés constituant préférentiellement les sites de clivage des calpaïnes	74
Figure 19 : Rôle des calpaïnes dans la migration cellulaire	78
Figure 20 : Liens entre calpaïnes et autophagie	85
Figure 21 : Implication des calpaïnes dans la survie et les différents types de mort cellulaires.....	91
Figure 22 : Prédiction du site de clivage de Met en p45 Met par les calpaïnes	124
Figure 23 : Bilan des clivages du récepteur Met par les calpaïnes et les métalloprotéases membranaires	155
Figure 24 : Sites de clivages de Met par les calpaïnes	164
Figure 25 : Schéma des différents clivages de Met observés dans les tumeurs pulmonaires.....	176

LISTE DES ABREVIATIONS

μ-calpaïne : micro-calpaïne
ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase Domain containing protein
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AIF : Apoptosis Inducing Factor
ALLM : *n*-Acetyl-Leucine-Leucine-Methionine-aldehyde
ALLN : *n*-Acetyl-Leucine-Leucine-Norleucine-aldehyde
ANT : Adenine Nucleotid Translocator
APAP : *n*-Acétyl-Para-AminoPhénol (paracétamol)
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ATG : AuTophagy Gene
ATP : Adenosine 5'-TriPhosphate
Aβ : *amyloid-beta* peptide
Bad : Bcl-2 Antagonist of cell Death
Bak : Bcl-2 Antagonist/Killer
Bax : Bcl-2-Associated X protein
Bcl-x_L : Bcl-2 related protein, Long Isoform
BH : Bcl2 Homology domain
Bid : BH3-Interacting domain Death agonist
Bim : Bcl-2-Interacting mediator of cell death
Caspase : Cysteiny ASPartatic Acid proteASE
CBL : Casistas B-lineage Lymphoma
CCl₄ : chlorure de carbone
CRK : CT10 (chicken tumor virus number 10) regulator of kinase
CRMP3 : Collapsin Response Mediator Protein 3
CTF : C-Terminal Fragment
CypD : CYcloPhilin D
DCC : Deleted in Colorectal Cancer
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
ErbB : avian ERYthroBlastosis oncogene B
ERK : Extracellular signaling-Regulated Kinase
ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FADD : Fas-Associated Death Domain
FAK : Focal Adhesion Kinase
FAS : Fibroblast Associated
Fas-L : Fas Ligand
FGF : Fibroblast Growth Factor
GAB-1 : Grb2-Associated Binder-1
GABA : Gamma AminoButyric Acid
GDP : Guanosine DiPhosphate
GRB-2 : Growth factor Receptor-Bound protein-2
GTP : Guansine TriPhosphate
HB-EGF : Hepraine-Binding EGF
HGF/SF : Hepatocyte Growth Factor/Scattor Factor
HIF-1 : Hypoxia Inducing Factor-1
HRS : HGF Regulated tyrosine kinase Substrate
HSP : Heat Shock Protein
ICD : IntraCellular Domaine
IPT : Immunoglobulin-like region in Plexin and Transcription factors
ITK : Inhibiteurs de l'activité Tyrosine Kinase
IκBα : nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells Inhibitor, alpha
JNK : c-Jun N-terminal Kinase
KI : Knock-In
KO : Knock-Out
LPA : LysoPhosphatidic Acid
LRIG1 : Leucin-rich Repeats and ImmunoGlobulin-like domains 1
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MBD : Met Binding Domain
m-calpaïne : milli-calpaïne
MDCK : Madin-Darby Canine Kidney
MDM-2 : Murine Double Minute-2
MEF : Mouse Embryonic Fibroblast
miARN : micro Acide RiboNucléique
MMP : Matrix MetalloProteinase
MNNG : n-Methyl-n'-Nitro-n-NitrosoGuanine
MSP : Macrophage Stimulating Protein
NF- κ B : Nuclear Factor-kappa B
NGF : Nerve Growth Factor
NTF : N-Terminal Fragment
p75^{NTR} : p75 NeuroTrophin Receptor
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PGE2 : ProstaGlandine E2
PH : Pleckstrin Homology
Pi : groupement Phosphate Inorganique
PI3K : Phospholinositide 3 Kinase
PIP3 : PhosphatidyInositol (3,4,5)-Triphosphate
PKC : Protein Kinase C
PLC γ : Phospholipase C-gamma
PP2A : Protein Phosphatase 2A
PSI : Plexin, Semaphorine, Integrin domain
PS-RIP : Presenilin-Regulated Intramembrane Proteolysis
PTEN : Phosphatase and TENSin Homologue
PTP : Permeability Transition Pore
RET : Rearranged durong Transfection
RNS : Reactive Nitrogen Species
RON : Récepteur d'Origine Nantais
ROS : Reactive Oxygen Species
RTK : Receptor Tyrosine Kinase
SH-2 : Src Homology 2
SHP-2 : Src Homology 2-containing tyrosine Phosphatase
siRNA : small interfering RiboNucleic Acid
SMAC/Diablo : Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding protein with LOw Pi.
SOS : Son-of Sevenless
STAT-3 : Signal Transducer and Activation of Transcription-3
TGF : Transforming Growth Factor
TNF : Tumor Necrosis Factor
TPR : Translocated Promoter Region
TRADD : TNF Receptor-Associated Death Domain
TRAIL : TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand
V-DAC : Voltage-Dependent Anion Channel
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

INTRODUCTION

I. Le récepteur Met et son ligand, l'HGF/SF

A) La découverte du couple HGF/SF-Met

En 1984, il y a tout juste 30 ans, le récepteur tyrosine kinase (RTK) Met est découvert sous la forme oncogénique TPR-Met, à partir de la lignée cellulaire HOS (Human OsteoSarcoma) transformée par un carcinogène chimique (Cooper et al., 1984). TPR-Met est une protéine de fusion résultant d'un réarrangement chromosomique entre un fragment de 10kb du chromosome 1 et un fragment de 9kb du chromosome 7 (Park et al., 1986). La séquence du premier fragment code pour le domaine de dimérisation, de type glissière à leucines, d'une protéine du pore nucléaire, TPR (Translocated Promoter Region). La séquence du second fragment montre une forte homologie avec les séquences des domaines intracellulaires des RTKs. Il s'agit en fait de la partie intracellulaire d'un nouveau récepteur, baptisé Met en référence à l'agent carcinogène utilisé, le N-Methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanine (Park et al., 1987). La protéine chimérique TPR-Met doit son activité transformante à la partie TPR, qui entraîne sa dimérisation permanente et par conséquent l'activation constitutive du domaine kinase de Met (Rodrigues and Park, 1993).

A la même époque, le ligand de Met, l'HGF/SF est identifié indépendamment par deux équipes différentes, d'où sa double dénomination. En effet, il est isolé en 1984, à partir de plasma de rats partiellement hépatectomisés, en tant que facteur mitogène pour des cultures d'hépatocytes et nommé Hepatocyte Growth Factor (HGF) (Nakamura et al., 1984). En 1987, il est purifié, à partir de cultures de fibroblastes embryonnaires, comme un facteur capable d'induire la dispersion de cellules épithéliales et baptisé Scatter Factor (SF) (Stoker et al., 1987).

Sept ans après la découverte de Met, il est montré que l'HGF est son ligand. En effet, l'HGF s'associe physiquement avec Met et le traitement de cellules avec l'HGF induit la phosphorylation de Met (Bottaro et al., 1991; Naldini et al., 1991a). De plus, la transfection du récepteur Met dans des cellules COS-7, qui ne répondent pas à un traitement HGF en temps normal, induit leur prolifération suite à l'ajout d'HGF (Higuchi et al., 1992). La même année, il est montré que l'HGF et le SF sont une seule et même protéine, codées par la même séquence d'ADN, présentant la même affinité pour le récepteur Met et capables d'induire les mêmes réponses cellulaires. Dès lors, ce facteur est rebaptisée HGF/SF (Naldini et al., 1991b; Weidner et al., 1991)

B) L'activation de Met par l'HF/SF

1) L'HGF/SF

Le gène *hgf/sf* est situé sur la bande q21.1 du chromosome 7. Il est constitué de 18 exons et 17 introns (Seki et al., 1991). L'HGF/SF est une glycoprotéine sécrétée sous la forme d'un précurseur inactif, le pro-HGF, et retenue dans la matrice extracellulaire environnante par des protéoglycans de type héparine (Kobayashi et al., 1994; Lyon et al., 1994). Son activation nécessite un clivage unique qui peut être assuré par l'activateur de l'HGF (HGF-A) ou les protéases à sérine transmembranaires matripase et hépsine (Owen et al., 2010).

Le pro-HGF devient alors une protéine hétérodimérique de 82 kDa, composée d'une sous-unité α de 69 kDa et d'une sous-unité β de 34 kDa reliées par des ponts disulfures (Figure 1) (Nakamura et al., 1987). La sous-unité α possède un domaine N-terminal (domaine N), parfois appelé domaine HL (hairpin loop), et quatre domaines en boucles (domaines kringle, K1 à K4). La chaîne β , parfois appelée domaine SPH (Serine Protease Homology) présente une forte homologie avec le domaine sérine protéase du plasminogène mais est dénuée d'activité catalytique (Seki et al., 1991).

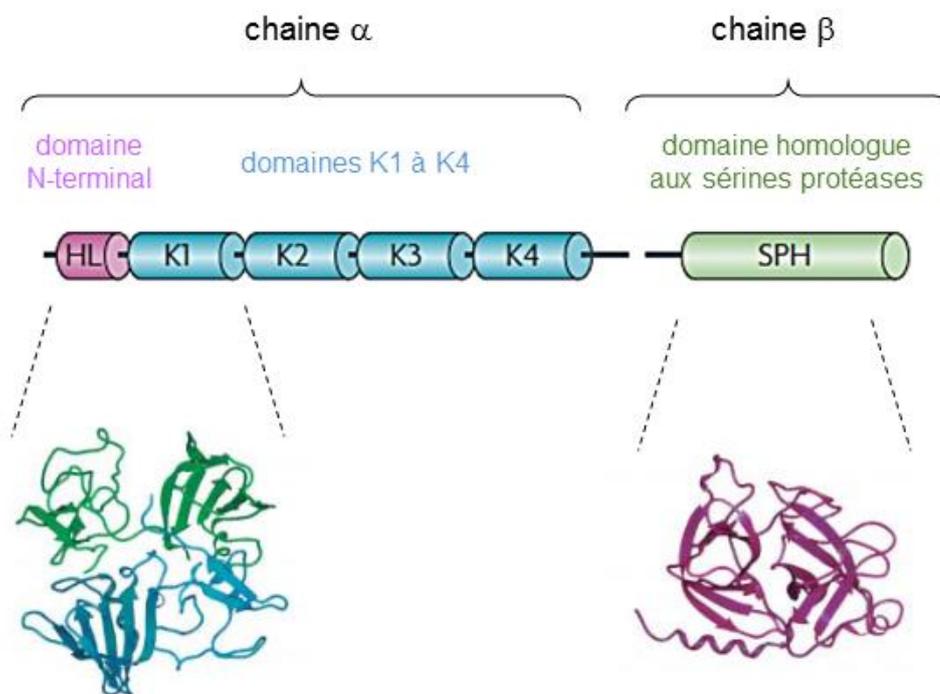


Figure 1 : Domaines et structure tridimensionnelle de l'HGF/SF
schéma tiré de (Trusolino et al., 2010) et structure tridimensionnelle tirée de (Birchmeier et al., 2003)

2) Le récepteur Met

Le gène *met* se situe sur la bande 7q2-q31 du chromosome 7. Il compte 120 kb répartis sur 21 exons et 20 introns. Son transcrit principal est de 8 kb (Lin et al., 1998). Cet ARN messager (ARNm) est traduit sous la forme d'une protéine glycosylée de 170 kDa, le Met immature, clivé par la furine en Met mature au niveau d'un site consensus situé entre la lysine K307 et l'arginine R308. (Komada et al., 1993).

Le Met mature est un hétérodimère composé d'une sous-unité α de 50 kDa et d'une sous-unité β de 145 kDa reliées par des ponts disulfures (Figure 2) (Tempest et al., 1988). Alors que la chaîne α est entièrement extracellulaire, la chaîne β possède une région extracellulaire, un domaine transmembranaire et une partie intracellulaire (Chan et al., 1988).

La partie extracellulaire de Met lie l'HGF/SF. Les 500 premiers acides aminés comprennent la chaîne α et la partie N-terminal de la chaîne β et constituent le domaine Sema, nommé ainsi en raison de son homologie avec les domaines caractéristiques des sémaphorines, des protéines de guidage des axones. L'analyse de l'ectodomaine de Met par cristallographie révèle une organisation du domaine Sema en 7 pales concentriques, chacune constituée de 4 feuillets β antiparallèles (Stamos et al., 2004). Le domaine Sema est suivi d'une séquence riche en cystéines, le domaine PSI, qui doit son nom à son homologie avec des domaines trouvés dans les plexines, les sémaphorines et les intégrines. Viennent ensuite quatre domaines homologues aux immunoglobulines baptisés IPTs (Immunoglobulin-like region in Plexin and Transcription factors). Alors que le domaine Sema est globulaire, les domaines PSI et IPTs sont organisés de façon longiligne (Gherardi et al., 2003).

La partie extracellulaire est suivie d'un unique domaine transmembranaire puis de la partie intracellulaire du récepteur. Celle-ci se compose d'une région adjacente au domaine transmembranaire appelée domaine juxtamembranaire et principalement impliquée dans le contrôle négatif de Met, d'un domaine kinase qui porte l'activité catalytique et, en C-terminal, d'un site de recrutement multi-substrats, qui recrute les partenaires intracellulaires lorsque le récepteur Met est activé. Le domaine tyrosine kinase possède une structure bilobée constituée de feuillets β en N-terminal et d'hélices α en C-terminal, organisation classique chez les RTKs (Schiering et al., 2003; Wang et al., 2006).

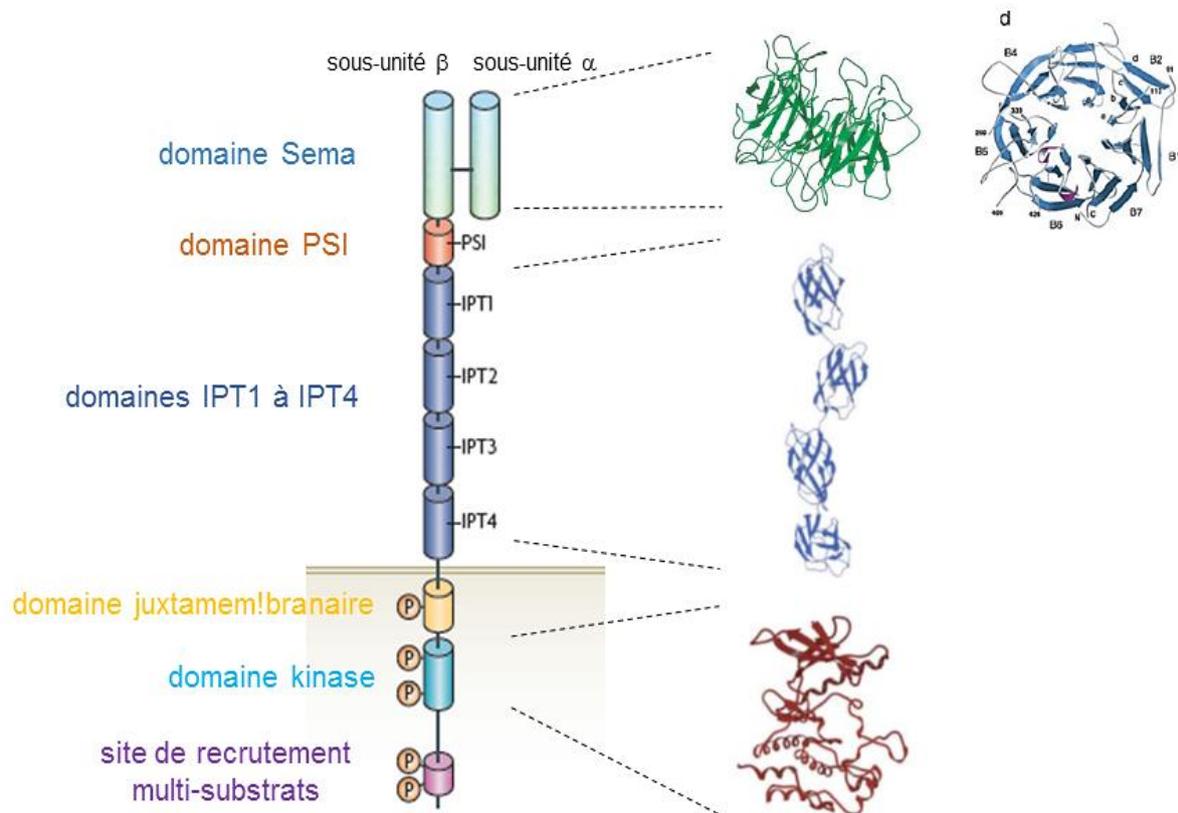


Figure 2 : domaines et structures tridimensionnelles du récepteur Met
schéma tiré de (Trusolino et al., 2010) et structures tridimensionnelles tirées de (Birchmeier et al., 2003) et (Gherardi et al., 2003)

3) Liaison de l'HGF/SF au récepteur Met

L'HGF/SF lie le récepteur Met avec une forte affinité (constante de dissociation $K_d = 30$ pM) (Higuchi et al., 1992). De nombreuses études ont été réalisées afin de caractériser l'interaction de ces deux protéines d'un point de vue structural.

Il a ainsi été démontré que la fixation de l'HGF/SF à Met fait intervenir deux sites de liaison, de faible et de forte affinité. La chaîne β de l'HGF/SF reconnaît une zone située entre les pales 2 et 3 du domaine Sema de Met avec une faible affinité ($K_d = 90$ nM) (Stamos et al., 2004). Les domaines N et K1 (NK1) de la chaîne α constituent quant à eux le site de liaison de forte affinité et interagissent avec le récepteur Met grâce à deux ensemble d'acide aminés (Lokker et al., 1992, 1994). Le site de fixation de la chaîne α sur Met n'est pas clairement identifié à l'heure actuelle. En effet, un groupe le situe au niveau des domaines IPT3 et IPT4 (Basilico et al., 2008) tandis que d'autres données indiquent qu'il se localise au sein du domaine Sema (Kong-Beltran et al., 2004; Gherardi et al., 2006).

De manière intéressante, le pro-HGF, la chaîne α et la chaîne β , bien que capables de se lier au récepteur Met, n'ont pas l'aptitude d'induire ses réponses biologiques, soulignant l'importance de la présence simultanée des deux sites de liaison à Met pour induire une signalisation correcte du récepteur (Lokker et al., 1992). Cependant, il a été montré que le NK1 se comporte comme un agoniste partiel en présence d'héparanes sulfates (Schwall et al., 1996; Jakubczak et al., 1998). Les propriétés de ces différents variants de l'HGF/SF en font des candidats de choix dans le développement de thérapies visant à inhiber ou stimuler l'activité de Met (Jones et al., 2011; Mizuno and Nakamura, 2013).

Deux molécules d'HGF/SF peuvent dimériser via une interaction tête-bêche des domaines NK1, induisant la dimérisation de Met (Figure 3) (Gherardi et al., 2006). Le complexe formé permet aux deux domaines kinases de Met de s'autophosphoryler sur les tyrosines Y1234 et Y1235, localisées au sein de la boucle d'activation du domaine kinase (Ferracini et al., 1991; Longati et al., 1994; Naldini et al., 1991c). La phosphorylation de ces deux résidus favorise l'activité kinase intrinsèque du récepteur et permet la phosphorylation d'autres tyrosines, notamment les résidus Y1349 et Y1356 du site de recrutement multi-substrats C-terminal de Met. Une fois activé, ces deux acides aminés recrutent les protéines capables d'initier les voies de signalisation du récepteur Met, à l'origine de l'action biologique du couple HGF/SF Met (Ponzetto et al., 1994).

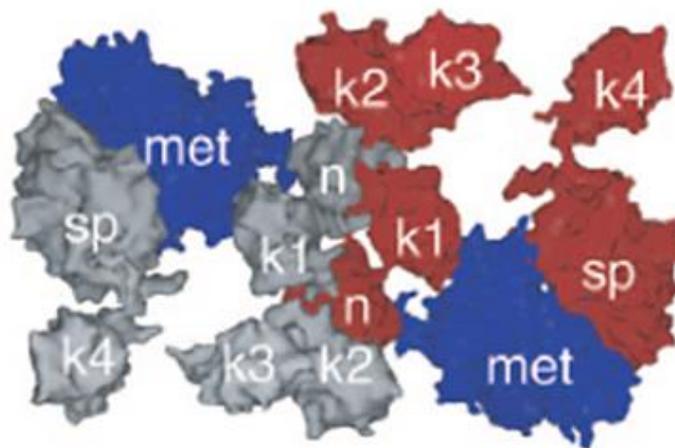


Figure 3 : Modélisation de l'interaction entre HGF/SF et Met

Modèle 2:2 du complexe HGF/SF-Met. Le récepteur Met est capable de fixer une molécule d'HGF/SF. Dans cette représentation, les deux sites de fixation de l'HGF/SF s'associent au domaine Sema de Met. Les deux molécules d'HGF/SF sont associées par interaction tête-bêche des domaines N-terminaux et kringles 1, permettant le rapprochement de deux récepteurs. n : domaine N-terminal, k : domaine kringles, sp : domaine d'homologie aux protéases à sérine. Tiré de (Gherardi et al., 2006)

II. Rôles physiologiques et signalisation du couple HGF/SF-Met

A) Les nombreux rôles physiologiques du couple HGF/SF-Met

1) Des facteurs pléiotropiques *in vitro*

L'activation de Met par l'HGF/SF induit une grande variété de réponses biologiques sur des cultures cellulaires. En effet, le récepteur Met induit la prolifération, outre des hépatocytes primaires, de la plupart des cellules épithéliales. De même, son activation induit la motilité de nombreux types cellulaires ainsi que leur dispersion, c'est-à-dire leur dissociation puis leur éloignement les unes des autres. L'activation de Met par l'HGF/SF favorise également l'invasion, c'est-à-dire la capacité de cellules à progresser à travers une couche d'agar, de collagène ou de reconstituants de la matrice extracellulaire (Maulik et al., 2002; Trusolino et al., 2010). Le couple HGF/SF-Met permet aussi la mise en place d'une réponse biologique plus complexe : la morphogenèse de branchement. En effet, des cellules épithéliales cultivées dans un milieu tridimensionnel reconstituant la matrice extracellulaire se rassemblent spontanément en cystes. L'ajout d'HGF/SF induit une ramification de ces cystes, qui se connectent et reconstituent *in vitro* des structures proches de leur organe d'origine (Montesano et al., 1991; Brinkmann et al., 1995).

Le récepteur Met et son ligand exercent également un contrôle important de la balance survie-apoptose. Ainsi, l'HGF/SF favorise la survie de la plupart des types cellulaires face à différents stress, comme une déplétion en sérum ou l'ajout d'un agent pro-apoptotique (Longati et al., 1996; Yo et al., 1998). A l'inverse, un effet cytotatique et pro-apoptotique de l'HGF/SF a été mis en évidence dans certains modèles cellulaires, principalement des lignées cancéreuses ou les myofibroblastes responsables de la mise en place d'un tissu cicatriciel excédentaire lors des fibroses (Matteucci et al., 2001; Kim et al., 2005).

Le couple HGF/SF-Met est également impliqué dans l'angiogenèse. En effet, il est capable de stimuler la survie, la prolifération)la migration l'invasion et la tubulogenèse de cellules endothéliales. Il favorise aussi l'expression par les cellules endothéliales de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGFR2 et inhibe l'expression d'inhibiteurs de l'angiogenèse comme la thrombospondine I (TSP-1) (Bussolino et al., 1992; Abounader and Laterra, 2005; Sulpice et al., 2009).

Enfin, l'HGF/SF induit également la survie et la motilité de motoneurons embryonnaires et induit la survie, la croissance de neurites et la différenciation de neurones sensibles,

démontrant un rôle dans le contrôle de réponses des cellules nerveuses (Maina and Klein, 1999).

2) Implication du couple HGF/SF-Met dans le développement embryonnaire

A l'échelle de l'organisme, le couple HGF/SF-Met est impliqué dans la mise en place et l'homéostasie de nombreux tissus.

L'étude des patrons d'expression de l'HGF/SF et de Met chez la souris permet de suggérer un rôle dans de nombreux processus de l'embryogenèse. Durant la gastrulation, l'étape durant laquelle de nombreux mouvements cellulaires permettent la mise en place des différents feuillets, l'HGF/SF et Met sont conjointement exprimés dans l'endoderme et une partie de la ligne primitive du mésoderme puis de la corde et de la notochorde. L'HGF/SF et Met pourraient donc jouer un rôle dans le contrôle des mouvements cellulaires de la gastrulation et lors de la mise en place de l'axe antéro-postérieur. Ils agiraient alors selon un mode d'action autocrine. Au cours de l'organogenèse, l'expression conjointe du récepteur Met et de son ligand persiste quelques jours dans le cœur, les somites en cours de condensation et les crêtes neurales mais finit par s'arrêter. En parallèle, un second profil d'expression se met en place. En effet, Met est détecté dans les cellules épithéliales de nombreux organes (foie, rein, poumon, glande mammaire...) alors que l'HGF/SF est exprimé par les cellules mésenchymateuses proches. Cette expression complémentaire suggère la participation de l'HGF/SF, via un mode d'action paracrine, à la mise en place des organes épithéliaux, un phénomène contrôlé par les tissus mésenchymateux adjacents (Sonnenberg et al., 1993; Andermarcher et al., 1996). Outre, les cellules épithéliales, le récepteur Met est aussi détecté dans des myoblastes du dermomyotome, la partie dorsale des somites (Bladt et al., 1995; Andermarcher et al., 1996) ainsi que des cellules nerveuses comme les crêtes neurales, des précurseurs des motoneurones et plusieurs zones du futur cerveau (Jung et al., 1994; Andermarcher et al., 1996). Ces observations suggèrent un rôle du couple HGF/SF-Met dans la mise en place de structures musculaires et nerveuses.

Dans les années 90, l'invalidation (ou KO pour Knock Out) des gènes *hgf/sf* et *met* chez la souris permet de confirmer leur rôle crucial dans l'embryogenèse (Figure 4). En effet, des souris *met* *-/-* ou *hgf/sf* *-/-* meurent *in utero* à 15 jours de développement (E15) et présentent des phénotypes similaires, confirmant le lien fonctionnel entre l'HGF/SF et Met. Les embryons invalidés, plus petits que les embryons sauvages, présentent un défaut d'organisation du trophoblaste labyrinthique du placenta, causant une réduction des échanges materno-fœtaux à l'origine de leur mort (Uehara et al., 1995). Ils présentent également une réduction de la taille du foie, due à une diminution de la prolifération et une

augmentation de l'apoptose des hépatocytes (Schmidt et al., 1995). Enfin, ces embryons présentent une absence de muscles squelettiques dans les bourgeons des membres, le diaphragme et le sommet de la langue (Bladt et al., 1995). En effet, l'HGF/SF est exprimé dans les bourgeons de membres tandis que le récepteur Met est exprimé dans les myoblastes du dermomyotome. Grâce à ses activités pro-mitotiques et chémo-attractante, l'HGF/SF induit la migration et la prolifération des myoblastes (Maina et al., 1996).

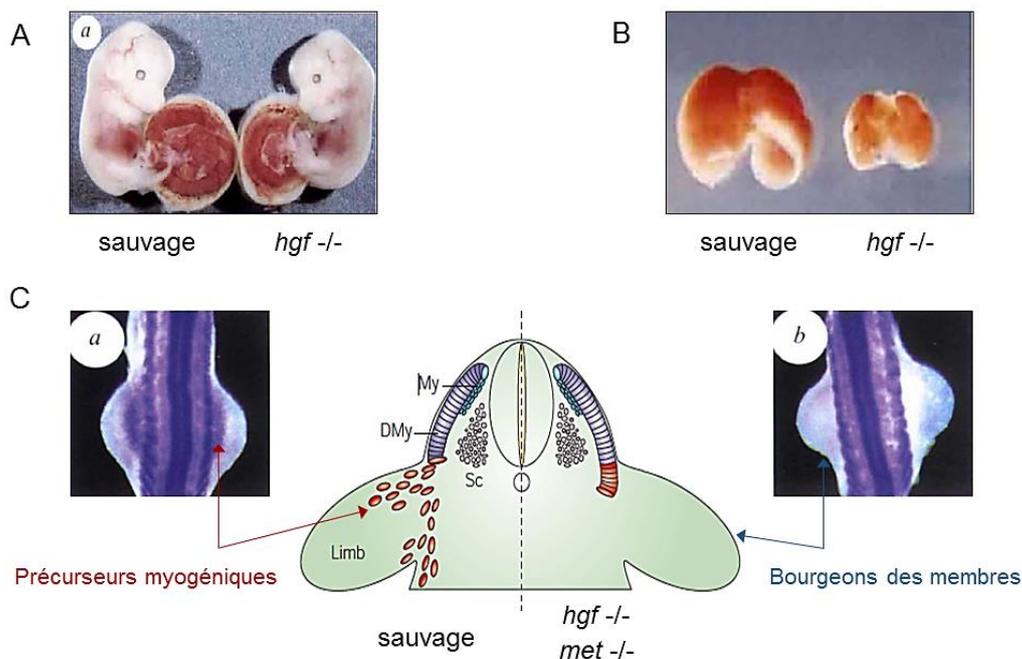


Figure 4 : Phénotypes de souris KO pour l'HGF/SF ou Met

A – Apparence externe d'embryons de souris sauvages et hgf/sf^{-/-} à E13,5 (tiré de Uehara et al., 1995). B – Foies d'embryons de souris sauvages et hgf/sf^{-/-} à E14,5 (tiré de Schmidt et al., 1995). C – Schéma de la migration et détection des précurseurs myogéniques dans les bourgeons des membres d'embryons de souris sauvages, hgf/sf^{-/-} ou met^{-/-} ?? à E9,5. My : myotome, DMy : Dermomyotom, Sc : sclérotome. D'après (Bladt et al., 1995) et (Birchmeier et al., 2003)

A partir des années 2000, des stratégies d'extinction conditionnelle permettent de détailler le rôle du couple HGF/SF-Met dans la mise en place de structures individuelles. Par exemple l'inactivation de Met dans les poumons inhibe significativement le développement alvéolaire (Calvi et al., 2013) tandis que son extinction dans les précurseurs des muscles squelettiques met en évidence son implication dans la mise en place de certains muscles faciaux (Prunotto et al., 2004). L'inactivation de Met dans les cellules des bourgeons urétéraux, des structures gouvernant le bon développement des néphrons des reins, induit une faible diminution du nombre de néphrons et une augmentation locale de l'expression du récepteur à l'EGF (EGFR), suggérant une compensation de la perte du récepteur Met par l'activation de l'EGFR. Des souris invalidées pour Met et l'EGFR présentent une diminution marquée de la taille des reins, et un nombre de néphrons fortement réduits. Cette expérience suggère une

collaboration ou une redondance entre Met et d'autres facteurs dans certaines étapes de l'embryogenèse (Ishibe et al., 2009). Il se pourrait donc que les stratégies actuelles de simple KO n'aient pas permis de mettre en évidence tous les processus gouvernés par le récepteur Met et son ligand lors du développement embryonnaire.

Le couple HGF/SF-Met est également impliqué dans la mise en place de structures nerveuses (Figure 5). Ainsi, l'étude de souris KI (« Knock In ») chez lesquelles le récepteur Met sauvage est remplacée par une version dépourvue d'activité kinase montre un rôle du couple HGF/SF-Met dans l'innervation sensorielle de la peau des membres et du thorax (Maina et al., 1997). L'extinction conditionnelle de Met dans le système nerveux central à partir de la moitié du développement embryonnaire démontre son implication dans la survie d'un groupe de motoneurones innervant le muscle du petit pectoral (Lamballe et al., 2011). Enfin, l'invalidation de Met dans la zone sous-corticale du cerveau induit une augmentation du nombre d'interneurones GABA-ergiques et altère la mémoire procédurale des souris (Martins et al., 2011). En accord avec ces résultats, une dérégulation de l'expression de Met dans certaines zones du cerveau ou la présence de mutations dans la séquence du récepteur Met ont été associées à des troubles neurologiques tels que l'autisme (Campbell et al., 2006; Peng et al., 2013).

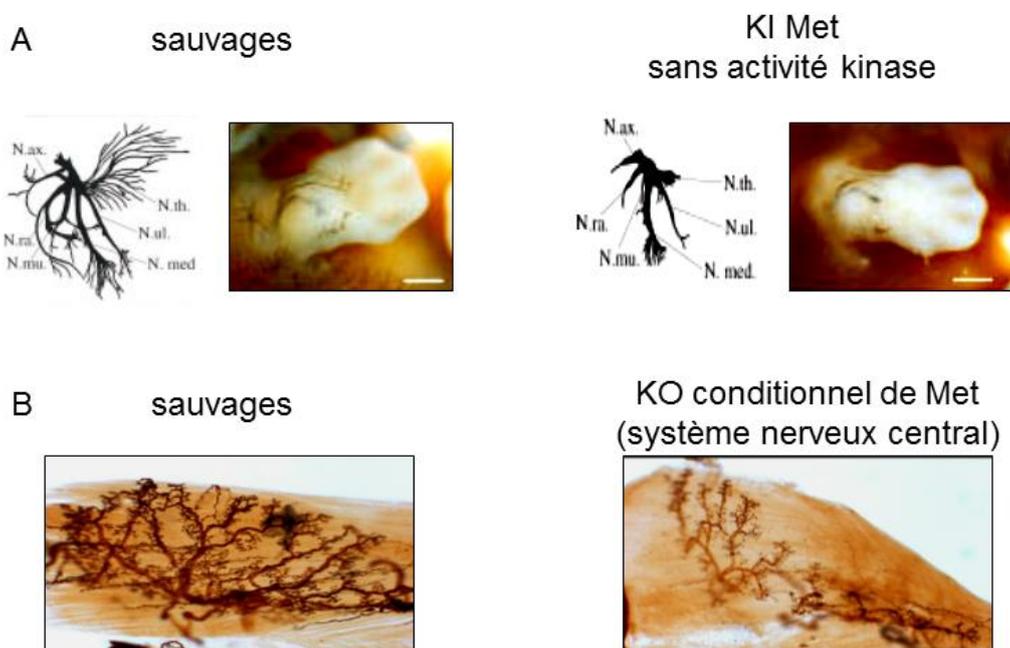


Figure 5 : Effet de l'inactivation ou de l'extinction conditionnelle de Met sur l'innervation des structures musculaires

A – Schéma des nerfs du membre antérieur (gauche) et marquage superficiel des neurofilaments du membre antérieur (droite) d'embryons de souris sauvages ou KI Met sans activité kinase à E12,5. D'après (Maina et al., 1997). B – Marquage des neurofilament de la région claviculaire du petit pectoral chez des souris sauvages ou KO pour Met dans le système nerveux central à la naissance. D'après (Lamballe et al., 2011).

3) Implication du couple HGF/SF-Met dans l'homéostasie épithéliale chez l'adulte

Chez l'adulte, le couple HGF/SF-Met joue un rôle important dans la régénération des tissus et organes qui l'expriment. Par exemple, le taux d'HGF/SF augmente fortement dans le plasma de rats ayant subi une hépatectomie partielle ou une injection de l'agent toxique tétrachlorure de carbone (CCl₄), de même que chez des patients ayant aussi subi une hépatectomie partielle. L'augmentation d'HGF/SF atteint un maximum après 24 à 48 heures puis diminue tout en restant au-dessus de la normale pendant quelques semaines (Asami et al., 1991; Michalopoulos and DeFrances, 1997). Cette augmentation suggère un rôle du couple HGF/SF Met dans la régénération du foie. Des expériences d'extinction conditionnelle de Met ou de l'HGF/SF dans le foie confirment ce rôle puisque la perte d'expression de Met ou de son ligand retarde la régénération du foie après hépatectomie ou injection de CCl₄ et le rend plus sensible à des agents pro-apoptotiques comme des anticorps anti-Fas (Borowiak et al., 2004; Huh et al., 2004; Phaneuf et al., 2004). Au contraire, l'injection d'HGF/SF recombinant ou de plasmides codant pour l'HGF/SF à des souris exprimant le récepteur Met favorise la régénération de foies lésés (Shiota et al., 1994; Kosai et al., 1998).

Le couple HGF/SF-Met induit les mêmes effets dans de nombreux autres organes et tissus. Ainsi, une augmentation de l'HGF/SF et/ou de Met est observée dans des modèles d'infarctus du myocarde, (Christensen et al., 2003) de lésions rénales (Kawaida et al., 1994; Mizuno et al., 2008; Rabkin et al., 2001), pulmonaires (Ohmichi et al., 1996) ou de la moelle épinière (Shimamura et al., 2007). L'extinction de Met dans les kératinocytes, les reins ou le thymus inhibe respectivement la cicatrisation de la peau (Chmielowiec et al., 2007), la régénération des reins (Ma et al., 2009; Mason et al., 2014) ou la régénération du thymus (Song et al., 2014). A l'inverse, l'administration d'HGF/SF favorise la régénération du myocarde (Jin et al., 2003), des reins (Igawa et al., 1993; Kawaida et al., 1994), des poumons (Ohmichi et al., 1996) ou de la moelle épinière (Shimamura et al., 2007). Pour finir, il a été montré que l'activation du couple HGF/SF Met favorise l'angiogenèse, notamment dans des modèles d'ischémie (Morishita et al., 1999).

En plus de favoriser la reconstitution de nombreux organes, le couple HGF/SF-Met limite le développement de certaines fibroses. En effet, des lésions et une inflammation prolongés génèrent le dépôt d'un excès de matrice extracellulaire par des cellules spécifiques, les myofibroblastes. Ainsi, il a été montré dans des modèles murins que l'HGF/SF permet d'atténuer des fibroses du foie (Sato et al., 2000) et du reins (Yang et al., 2003). Il permet en effet d'induire la production par les cellules endothéliales de PGE₂ (Prostaglandine E₂), qui exerce une action anti-proliférative sur les myofibroblastes (Greenhough et al., 2009). De

plus, en activant le récepteur Met exprimé par les myofibroblastes, il induit directement leur apoptose, même si les mécanismes médiant cet effet n'ont pas été déterminés (Yang et al., 2003; Kim et al., 2005). Dans le foie, l'HGF/SF favorise aussi la production de métalloprotéases permettant de dégrader la matrice excédentaire par les cellules Küpfer (Ozaki et al., 2002).

Toutes ces propriétés font de l'HGF/SF une molécule thérapeutique potentielle dans le traitement de nombreux troubles comme les insuffisances hépatiques, la cirrhose du foie, les fibroses ou les troubles cardiovasculaires (pour une revue exhaustive voir (Nakamura and Mizuno, 2010)). Ainsi, une thérapie génique reposant sur l'utilisation de plasmides codant pour l'HGF/SF chez des patients atteints d'ischémies critique des membres inférieurs a montré des résultats bénéfiques lors d'essais de phase III (Shigematsu et al., 2010). L'injection systémique d'HGF/SF recombinant est actuellement à l'étude et ne semble pas induire d'effets secondaires importants (Ido et al., 2011). En parallèle, des efforts sont faits pour générer des biomolécules capables d'activer le récepteur Met. Par exemple la synthèse chimique des domaines N et K1 de l'HGF a récemment été réalisée (Ollivier et al., 2012; Raibaut et al., 2013). Ces parties de l'HGF/SF pourraient présenter une meilleure biodisponibilité *in vivo* et pourraient être aisément modifiées chimiquement. Récemment, une équipe a conçu une protéine NK1 contenant des mutations ponctuelles qui accroissent sa stabilité (grâce à des mutations au niveau des sites d'interaction de NK1 avec Met ou les héparines) et induisent sa dimérisation constitutive permettant d'augmenter son activité (grâce à des mutations au sein du domaine d'interaction entre deux protéines NK1) (Jones et al., 2011). En outre, de petites molécules ont également été récemment synthétisées dans le but d'activer le pro-HGF en absence de son clivage en HGF/SF mature (Landgraf et al., 2014).

B) La signalisation du couple HGF/SF-Met

Les nombreuses réponses biologiques induites par le couple HGF/SF-Met reposent sur un réseau de signalisation complexe, mis à jour à partir années 90. La liaison de l'HGF/SF active le récepteur Met ainsi que de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Par des phosphorylations en cascade, celles-ci transforment les informations détectées dans l'environnement en une réponse cellulaire spécifique. Cette réponse à l'HGF/SF varie suivant le type cellulaire ou le contexte. En effet, la réponse induite par la signalisation est modulée par de nombreux partenaires membranaires ainsi que par l'activation préférentielle de certaines voies de signalisation. Ainsi, malgré ses capacité pléiotropique, le récepteur Met

peut orienter les cellules vers une réponse spécifique (Trusolino et al., 2010; Gherardi et al., 2012).

1) Les cascades de signalisation en aval du récepteur Met

L'activation de Met par l'HGF/SF induit sa trans-autophosphorylation sur les résidus tyrosine Y1034, Y1234 et Y1035, Y1235 du domaine kinase et des résidus Y1349 et Y1356 du site de recrutement multi-substrats. Une fois phosphorylés, ceux-ci recrutent la majorité des partenaires intracellulaires de Met, facilitant ainsi leur phosphorylation par Met (Figure 6) (Ponzetto et al., 1994). Le site de recrutement multi-substrats est d'une importance majeure pour la signalisation de Met. Ainsi, des souris exprimant par KI un récepteur Met muté sur les résidus Y1349 et Y1356 meurent *in utero* et présentent un phénotype similaire aux souris KO pour Met ou l'HGF/SF (Maina et al., 1996). Cependant, il a été montré qu'un récepteur Met muté sur ces résidus est toujours capable d'induire la dispersion de cellules épithéliales en réponse à l'HGF/SF, suggérant que certains signaux sont transmis indépendamment du site de recrutement multi-substrats (Tulasne et al., 1999).

Le recrutement des partenaires intracellulaires de Met peut être direct mais il peut également être effectué par l'intermédiaire de protéines adaptatrices dénuées d'activité kinase. Ces protéines adaptatrices permettent à la fois de fournir des sites de liaison supplémentaires et de recruter des protéines qui ne se lient pas directement au récepteur Met. Une fois activés, les partenaires recrutés par Met phosphorylent à leur tour de nombreux substrats, transmettant et amplifiant le signal jusqu'à des effecteurs finaux tels que des facteurs de transcription ou des protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette (Trusolino et al., 2010). Les principaux acteurs de la signalisation du couple HGF/SF-Met vont ici être décrits.

a. Recrutement des partenaires de Met : le rôle fondamental de GAB1

Le site de recrutement multi-substrats de Met lie de nombreux effecteurs : la PI3Kinase, la PLC γ 1 (PhosphoLipase C γ), SHP2 (Src Homology 2 domain-containing protein tyrosine Phosphatase 2), Src, FAK (Focal Adhesion Kinase) et le facteur de transcription STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3). Ce recrutement s'effectue *via* un domaine spécifique, le domaine SH2 (Src-Homology-2 domain) (Ponzetto et al., 1994; Fixman et al., 1996; Boccaccio et al., 1998; Chen and Chen, 2006).

Il lie aussi des protéines adaptatrices comme GAB1 (GRB2-associated-binding protein 1), qui semble indispensable pour relayer et amplifier la plupart des voies de signalisation en

aval de Met. En effet, des souris KO pour GAB1 meurent *in utero* en présentant un phénotype très similaire à celui des souris KO pour Met ou l'HGF/SF (Sachs et al., 2000). Du point de vue moléculaire, GAB1 est recruté directement par le résidu Y1349 au niveau de son site MBD (Met Binding Domain) (Weidner et al., 1996) et indirectement par le résidu Y1356 *via* une interaction avec GRB2 (Fixman et al., 1997). GAB1 sert de plate-forme de recrutement à un grand nombre de protéines : la PI3Kinase, SHC, la PLC γ , SHP2 ou encore CRK (Lock et al., 2000; Schaeper et al., 2000; Lock et al., 2003; Maroun et al., 2000; Garcia-Guzman et al., 1999).

b. GRB2 et les MAPKinases

GRB2 est une protéine adaptatrice recrutée sur le résidu Y1356 par l'intermédiaire de son domaine SH2 mais elle peut aussi être recrutée par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice SHC (SH2 domain Containing transforming protein) (Pelicci et al., 1995). L'importance de GRB2 a été démontrée par la génération de souris KI exprimant une version de Met incapable de recruter GRB2 mais toujours capable d'activer ses autres effecteurs. Ces souris meurent quelques semaines après la naissance, vraisemblablement de défauts respiratoires, et présentent un défaut de développement des muscles des membres. Ces défauts sont liés à une capacité réduite des myoblastes à survivre pendant la migration au vers les membres et à proliférer une fois les membres colonisés. Au contraire, la motilité des cellules n'est pas modifiée (Maina et al., 1996).

Suite à son activation par l'HGF/SF, Met recrute GRB2 lui-même lié à la protéine SOS (Son of Sevenless), un échangeur de guanidine. Le complexe GRB2-SOS interagit alors avec la protéine Ras, une protéine G localisée à la membrane. SOS favorise le remplacement des GDPs (Guanosine DiPhosphate) liés à Ras par des GTPs (Guanosine TriPhosphate). Dans cet état, Ras est alors sous forme active et phosphoryle la protéine Raf qui phosphoryle à son tour MEK1 (MAP/ERK Kinase 1), qui phosphoryle les protéines ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), les derniers acteurs de cette voie (Li et al., 1993). Les protéines ERKs ont pour cibles un grand nombre de protéines cytoplasmiques et permettent notamment un réarrangement du cytosquelette. ERK transloque également dans le noyau et active des facteurs de transcription comme ETS1 (E Twenty-Six 1) et c-Fos.

Une autre voie favorisant l'activation des MAPKinases est le recrutement de SHP2 par Met ou GAB1. En effet, SHP2 empêche le recrutement par GAB1 de la protéine inactivatrice de Ras p120-Ras-GAP, favorisant ainsi l'activation de ce dernier (Maroun et al., 2000).

c. La voie PI3Kinase/Akt

La PI3Kinase, ou PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase), est composée de deux sous-unités : p110, qui porte l'activité catalytique et p85, qui permet son recrutement (Vanhaesebroeck et al., 2005). La PI3K peut être recrutée directement par Met ou par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice GAB1 (Ponzetto et al., 1994). Une fois activée, la PI3K produit un second messenger lipidique membranaire, le PIP₃ (Phosphatidylinositol (3,4,5)triPhosphate) qui permettent le recrutement à la membrane de protéines contenant un domaine PH (Pleckstrin Homology domain), comme Akt. La protéine Akt est une sérine-thréonine kinase principalement impliquée dans la survie cellulaire (Xiao et al., 2001). En les phosphorylant, elle inhibe des protéines pro-apoptotiques comme BAD (Bcl2-Associated Death promoter), la pro-caspase 9 et l'inhibiteur du facteur de survie NF-κB, Iκk. Akt phosphoryle aussi des protéines pro-survie, favorisant dans ce cas leur action. C'est par exemple le cas pour MDM2, qui induit la dégradation de p53 (Fresno Vara et al., 2004).

d. Les voies de signalisation associées à l'internalisation de Met

Si le récepteur Met peut induire des cascades de signalisation depuis la membrane plasmique, son activation induit rapidement son internalisation par endocytose. Des études principalement menées dans des lignées cellulaires cancéreuses montrent que cette relocalisation permet au récepteur Met d'induire d'autres voies de signalisation et participe aux différences réponses biologiques induites par Met (Figure 8). Il reste cependant à déterminer si ces observations peuvent être généralisées (Barrow-McGee and Kermorgant, 2014).

Une fois internalisé dans les endosomes précoces, le récepteur Met induit la relocalisation des protéines ERKs à la membrane, au niveau des points focaux d'adhésion, les sites d'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. Cette relocalisation est dépendante de la PKCε et favorise la migration cellulaire, certainement *via* la phosphorylation par les protéines ERKs des constituants des points focaux d'adhésion comme la paxilline (Liu et al., 2002b; Kermorgant and Parker, 2005).

Depuis les endosomes précoces, le récepteur Met peut poursuivre son chemin à l'intérieur de la cellule en direction d'endosomes péri-nucléaires. Cette progression est médiée par la PKCα, qui favorise la migration des endosomes le long des microtubules (Kermorgant et al., 2003, 2004). Dans les endosomes péri-nucléaires, Met recrute le facteur de transcription STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3). S'ensuivent la dimérisation et la translocation dans le noyau de STAT3, qui induit l'expression de gènes impliqués dans la prolifération ou la différenciation (Boccaccio et al., 1998; Levy and Darnell, 2002). La localisation de Met dans ces endosomes proches du noyau est indispensable au

bon fonctionnement de STAT3. Depuis ces endosomes, Met joue aussi sur les réponses de motilité par l'intermédiaire de la protéine Rac1 (Ménard et al., 2014).

e. Un réseau de signalisation complexe

Plusieurs études ont tenté d'associer ces voies de signalisation à une réponse cellulaire précise. Ainsi, la voie des MAPKinases est généralement associée à la prolifération et la voie PI3K/Akt à la survie. Src est nécessaire à la croissance sans ancrage (Rahimi et al., 1998) et SHC à l'angiogenèse (Saucier et al., 2004). La PLC γ favorise la morphogenèse (Gual et al., 2000) et FAK la migration et l'invasion (Chen and Chen, 2006).

Cependant, une voie de signalisation n'est pas strictement restreinte à un phénotype cellulaire mais peut, au contraire, être impliquée dans de multiples réponses. Par exemple les MAPKinases sont non seulement importantes pour la prolifération mais sont aussi impliquées dans les réponses de survie (Xiao et al., 2001), de motilité (Kermorgant and Parker, 2005) ou de morphogenèse (O'Brien et al., 2004). A l'inverse, une réponse cellulaire résulte généralement de l'activation en parallèle de plusieurs voies de signalisation. Par exemple la morphogenèse de branchement nécessite l'activation des voies MAPKinase, PI3K/Akt, SHP2 et STAT3 ainsi que la production de métalloprotéases. Leur signalisation suivant une séquence bien précise permet la coordination de plusieurs processus cellulaires (prolifération, survie à l'anoikis, migration...) permettant aux cellules épithéliales stimulées de se réorganiser en structures tubulaires (O'Brien et al., 2004; Rosário and Birchmeier, 2003; Trusolino et al., 2010). Enfin, les différentes voies de signalisation du couples HG/SF-Met ne sont pas nettement séparées les unes des autres mais sont au contraire interconnectées. Par exemple l'activation de Ras par le complexe GRB2-SOS peut, en plus des MAPKinases MEK et ERK, activer la protéine Akt. Activé de cette manière, Akt permet l'activation des MAPKinases p38 et JNK, impliquées dans des processus cellulaires aussi divers que la prolifération, la transformation ou encore l'apoptose (Rodrigues et al., 1997; Recio and Merlino, 2002; Coltella et al., 2006). Le remplacement chez la souris de Met sauvage par des formes mutées recrutant préférentiellement Src, PI3K ou Grb2 (et GAB1) a des conséquences sur plusieurs étapes du développement, suggérant que toutes les voies de signalisation de Met sont nécessaires à l'ensemble de son action *in vivo* (Maina et al., 2001).

A l'heure actuelle, il est donc considéré qu'un ensemble de voies de signalisation, redondantes et interconnectées, participent conjointement aux réponses biologiques du couple HGF/SF-Met.

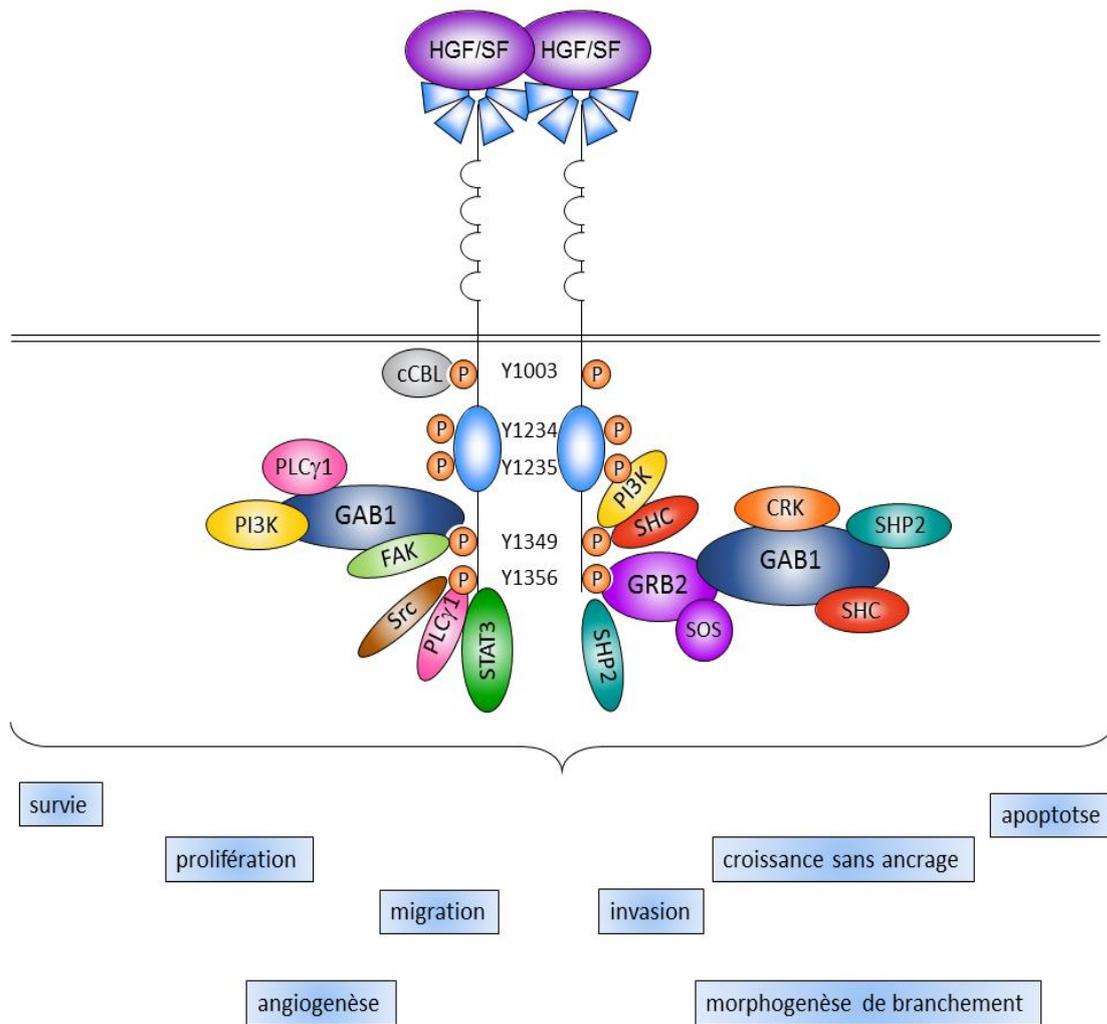


Figure 6 : Partenaires recrutés et réponses biologiques induites par le récepteur Met activé.

2) Rôle des partenaires membranaires : le réseau social de Met

Si les réponses à l'activation de Met sont médiées par de nombreuses protéines intracellulaires, les années 2000 voient Met nous dévoiler des partenaires membranaires et extracellulaires nécessaires à une signalisation efficace (Figure 7).

a. CD44

Les protéines membranaires CD44 ont initialement été décrites comme une famille de protéines d'adhésion à la matrice extracellulaire, notamment en tant que récepteurs à l'acide hyaluronique. Il en existe de nombreuses isoformes, qui diffèrent par leur partie extracellulaire et sont générées par épissage alternatif. Il est aujourd'hui connu que les CD44

peuvent aussi avoir des fonctions de signalisation et certaines isoformes interagissent avec le récepteur Met, lui servant de co-récepteur (Ponta et al., 2003).

Ainsi, l'isoforme CD44v3 est capable de lier l'HGF/SF par le biais d'héparanes sulfates et facilite sa présentation au récepteur Met. Ce phénomène amplifie l'activation de Met et l'activation de voies de signalisations comme la voie des MAPKinases et la voie PI3K/Akt (van der Voort et al., 1999).

Dans des cellules normales ou transformées, l'isoforme CD44v6 est indispensable à une réponse correcte de Met à l'HGF/SF. En effet, la partie extracellulaire de CD44v6 permet la formation d'un complexe ternaire entre Met, l'HGF/SF et CD44v6 tandis que la partie intracellulaire induit l'assemblage de la queue C-terminale du récepteur Met avec les protéines ERM (Ezrine, Radixine et Moesine), l'actine F, GRB2 et SOS. Cet assemblage est nécessaire à l'activation correcte de Ras et de la voie des MAPKinases par le complexe GRB2-SOS (Orian-Rousseau et al., 2002, 2007). Il a également récemment été démontré dans des cellules HeLa qu'en réponse à l'HGF/SF, le complexe CD44v-ERM-cytosquelette induit l'internalisation du récepteur Met dans les endosomes. Ce phénomène n'est pas un préalable nécessaire à la signalisation de Met mais est au contraire une conséquence de l'activation de la voie Ras (Hasenauer et al., 2013). Cependant, comme la nature de la signalisation de Met change en fonction de sa localisation cellulaire, CD44v6 pourrait, en induisant son internalisation, être impliquée dans la modulation de l'activité de Met. De manière intéressante, des peptides contenant une séquence de 3 acides aminés importante pour la liaison de Met à CD44v6 peuvent, par compétition, inhiber l'interaction entre ces deux protéines et inhiber l'activation de Met ainsi que les réponses de dispersion et de migration par l'HGF/SF (Matzke et al., 2007).

Dans des cellules endothéliales pulmonaires, l'isoforme CD44v10 est indispensable à l'activation de Met par l'HGF/SF. Le récepteur recrute alors les protéines Tiam1, la Cortactine et la Dynamine2 au niveau de microdomaines enrichis en cavéoline. Cette signalisation est impliquée dans le renforcement de l'intégrité de la paroi vasculaire (Singleton et al., 2007).

Enfin, le rôle de co-récepteur des protéines CD44 a été étudié *in vivo*. Bien que des souris *cd44*^{-/-} soient viables, l'absence d'un seul allèle de *met* ou d'*hgf/sf* chez ces souris entraîne la mort des embryons à la naissance, causée par une dérégulation du système nerveux respiratoire (Matzke et al., 2007). L'absence de phénotype permettant d'établir un lien plus manifeste entre Met et CD44 chez ces souris est due au recrutement par Met de la protéine hétérologue ICAM-1, qui permet de compenser la perte de CD44 (Olaku et al., 2011).

b. Les intégrines

Les intégrines forment une superfamille de glycoprotéines transmembranaires impliquées dans l'adhésion cellule-cellule ou cellule-matrice. Elles sont composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β , qui possèdent chacune de nombreux isoformes (respectivement 18 et 8). En tout, 24 hétérodimères sont connus et capables de lier le collagène, la laminine, ou les motifs RGD situés sur d'autres protéines d'adhésion (Takada et al., 2007).

L'association de Met avec certaines intégrines a été décrite dans des situations physiologiques comme la morphogénèse rénale ou l'angiogénèse. En effet, l'intégrine $\alpha3\beta1$ est un partenaire important de la signalisation de Met lors de la néphrogénèse. Leur association permet le recrutement de GAB1 et l'activation de la PI3Kinase. Cette signalisation induit l'expression du facteur Wnt7b, qui participe au bon développement des papilles rénales, dans lesquelles se déversent les tubules collecteurs des néphrons. Ainsi l'HGF/SF favorise d'avantage la survie d'explants de papilles rénales de souris sauvages que celle d'explants issus de souris KO pour l'intégrine $\alpha3\beta1$. A l'inverse, l'emploi d'anticorps bloquants de l'HGF/SF diminue la survie des explants de souris sauvages mais ne présente pas d'effet sur les explants de souris KO pour l'intégrine (Liu et al., 2009b). L'interaction de Met avec l'intégrine $\beta4$ joue quant à elle un rôle important pour la signalisation de Met dans les cellules endothéliales. En effet, Met et l'intégrine $\beta4$ interagissent au sein de microdomaines enrichis en cavéoline et cette interaction est nécessaire à l'activation correcte de Met, qui favorise le maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale. Comme décrit précédemment, CD44v10 a également été impliqué dans ce type de réponse biologique via son interaction avec Met au sein de domaines enrichis en cavéoline. Il reste encore à déterminer si ces deux complexes protéiques sont indépendants ou sont en réalité deux sous-parties d'une plus grande plate-forme de signalisation, parfois décrite comme un « signalosome » (Liu et al., 2002a; Ephstein et al., 2013).

L'interaction entre le récepteur Met et l'intégrine a aussi été décryptée au sein de lignées tumorales. Par exemple le récepteur Met interagit avec l'intégrine $\alpha6\beta4$, principal constituant des hémidesmosomes, des jonctions permettant de relier les cellules épithéliales à la matrice extracellulaire. Dans des lignées issues de carcinomes, l'activation du récepteur Met permet de convertir cette protéine d'adhésion en une plate-forme de signalisation favorisant la migration cellulaire. En effet, l'activation de Met induit la phosphorylation de la sous-unité β , qui déclenche le recrutement de la PI3Kinase, SHC et SHP2 et la dissociation des hémidesmosomes. Ainsi, l'intégrine $\alpha6\beta4$ constitue une protéine adaptatrice supplémentaire de Met jouant un rôle actif dans l'amplification de sa signalisation (Trusolino et al., 2001; Comoglio et al., 2003; Bertotti et al., 2006). A l'inverse, Met peut relayer le signal émis par certaines intégrines. Dans un modèle de cancer ovarien, l'activation de l'intégrine $\alpha3\beta5$ par

son ligand, la fibronectine, induit une activation de Met indépendante de l'HGF/SF. Met induit alors des réponses d'invasion et de métastase par le biais de la voie Src-FAK (Mitra et al., 2011).

c. Les plexines et les sémaphorines

Les plexines sont une famille de récepteurs membranaires ayant pour ligand les sémaphorines, des facteurs initialement identifiés comme des protéines de guidance de la croissance axonale et impliqués dans un nombre croissant de fonctions biologiques. Plexines et Sémaphorines possèdent toutes un domaine Sema homologue à celui de Met. Les plexines se divisent en 4 sous-familles (de A à D) parmi lesquelles les plexines B interagissent avec Met (Gherardi et al., 2004; Neufeld et al., 2012).

Ainsi, il a été montré qu'en absence de leurs ligands respectifs, la plexine B1 et le récepteur Met sont capables de s'associer physiquement par l'intermédiaire de leurs domaines Sema. L'ajout de la sémaphorine 4D, le ligand de la plexine B1, induit alors une activation de Met indépendante de l'HGF/SF et des réponses de migration, d'invasion et d'angiogenèse. Ce processus permet de placer le récepteur Met sous le contrôle d'autres facteurs extracellulaires que l'HGF/SF. De plus, en absence de Met, les réponses cellulaires à la sémaphorine 4D sont inhibées. Le récepteur Met constitue donc un relais nécessaire pour l'activité du couple plexine B1/sémaphorine 4D (Giordano et al., 2002; Conrotto et al., 2005, 2004). En accord avec ces résultats, dans une cohorte de cancer du sein et de cancer ovarien, la co-expression de Met et de la plexine B1 est associée à des tumeurs plus agressives présentant un grade plus élevé et une plus grande incidence de l'invasion des ganglions lymphatiques (Valente et al., 2009).

A l'inverse, il a été montré dans des mélanocytes et des lignées issues de mélanomes que la plexine B1 inhibe les réponses de migration et d'invasion induites par Met. Dans ce modèle, l'association de la plexine B1 à Met n'induit pas son activation mais, au contraire, le désensibilise à l'HGF/SF. En accord avec ces résultats, la perte de plexine B1 est associée à des mélanomes plus invasifs et métastatiques. Comme la plexine B1 favorise par ailleurs la survie de ces cellules, il est cependant difficile de conclure sur son rôle de suppresseur de tumeur dans ce modèle (Stevens et al., 2010; Soong et al., 2012; Soong and Scott, 2013). L'effet de la plexine B1 sur l'activité de Met semble donc très finement contrôlé et pourrait aboutir à des effets totalement opposés en fonction du type cellulaire et, vraisemblablement, de l'environnement moléculaire.

d. Le récepteur FAS : un rôle pro-apoptotique pour l'HGF/SF

Les partenaires de Met ne sont pas tous des corécepteurs prenant une part active dans sa signalisation. Met est également le garde-fou de FAS (Fibroblast Associated), un récepteur de mort de la famille des TNF. Classiquement, l'activation de Fas par son ligand Fas-L induit sa trimérisation et le recrutement, au niveau de sa queue cytoplasmique, du complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex). Le complexe DISC induit l'activation de caspases initiatrices et conduit à l'apoptose (Galluzzi et al., 2012).

Bien que, dans la plupart des types cellulaires, l'activation de Met induit l'activation de voies de survie comme la voie des PI3Kinases, une action pro-apoptotique de l'HGF/SF a été observée dans certains types cellulaires. En effet, dans les hépatocytes ainsi que les cellules endothéliales, l'association physique de FAS avec le récepteur Met empêche son recrutement par Fas-L et prévient l'apoptose. Ainsi, des souris surexprimant la partie extracellulaire de Met dans le foie sont plus résistantes à l'insuffisance hépatique induite par l'anticorps Jo2, un agoniste de FAS. Au contraire, l'ajout d'HGF/SF libère le récepteur Fas séquestré et sensibilise les cellules à des stimuli apoptotiques (Wang et al., 2002; Smyth and Brady, 2005). Le même mécanisme de sensibilisation à l'apoptose a été observé dans un modèle de leucémie aigue lymphoblastique (Accordi et al., 2007).

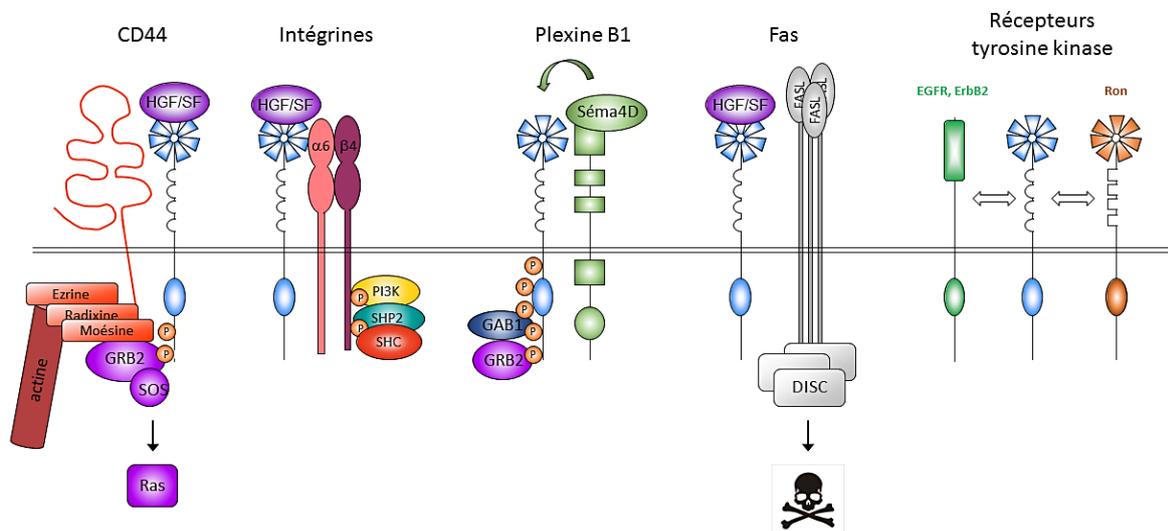


Figure 7 : Les partenaires membranaires de Met
D'après (Trusolino et al., 2010).

3) L'arrêt de la signalisation de Met

Le contrôle précis de l'activité de Met est nécessaire à l'obtention de réponses cellulaires et tissulaires correctes. A l'inverse, sa dérégulation peut être pathologique. Par exemple la

suractivation de Met est souvent observée dans le cancer (Wang et al., 2001; Peng et al., 2014). Plusieurs mécanismes, dépendants et indépendants de l'HGF/SF, permettent d'atténuer l'activation de Met et ainsi de réguler la durée et l'intensité de sa signalisation.

a. La phosphorylation de la Sérine S985

Dès 1994, il est montré que le récepteur Met peut être phosphorylé sur le résidu sérine S985, situé dans le domaine juxtamembranaire. L'état de cette phosphorylation résulterait d'une différence d'activité entre des kinases de type PKC et des phosphatases comme PP2A. La phosphorylation du résidu S985 est inhibitrice de l'activité kinase de Met. En effet, une version de Met phosphorylée sur le résidu S985 perd sa capacité à phosphoryler des substrats *in vitro*. Dans des cultures d'hépatocytes primaires, la phosphorylation de S985 inhibe également le récepteur Met et s'accompagne d'une internalisation de Met au sein d'endosomes ne participant pas à la signalisation. *In vivo*, cette phosphorylation, existante dans un foie sain, diminue suite à une hépatectomie et cette diminution est associée à l'activation de Met et à la prolifération des hépatocytes (Gandino et al., 1994; Hashigasako et al., 2004; Nakayama et al., 2013).

b. La dégradation de Met dépendante du ligand

La dégradation de Met suite à la liaison de l'HGF/SF constitue un important mécanisme de rétrocontrôle négatif de son activité (Figure 8). Ce phénomène fait intervenir le domaine juxtamembranaire. En effet, une version de Met deletée de l'exon 14, qui code pour ce domaine, présente une dégradation moins importante qu'une version entière du récepteur (Kong-Beltran et al., 2006; Asaoka et al., 2010).

Plus précisément, la dégradation de Met est médiée par le résidu tyrosine Y1001, phosphorylé en réponse au ligand. Cette phosphorylation permet de recruter la protéine c-CBL (Casitas B-lineage Lymphoma), une E3 ubiquitine ligase impliquée dans la dégradation de nombreux RTKs. c-CBL induit les premières étapes de l'internalisation de Met en recrutant la protéine CIN-85 (CBL-INTERacting protein 85) qui s'associe avec les endophilines, des régulateurs des clathrines. Endophilines et clathrines induisent l'invagination de la membrane plasmique puis l'individualisation de vésicules appelées endosomes précoces (Weidner et al., 1995; Peschard et al., 2001; Petrelli et al., 2002).

En plus de médier l'internalisation de Met, c-CBL l'adresse à la dégradation en réalisant sa mono-ubiquitination sur plusieurs résidus. Dans l'endosome, cette modification post-traductionnelle est reconnue par un adaptateur possédant des sites de liaison à l'ubiquitine, HRS (HGF Regulated tyrosine kinase Substrate) (Komada and Kitamura, 1995). L'interaction

de Met avec HRS (aussi nommé ESCRT-0) puis à d'autres complexes protéiques ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) permet son internalisation au sein de vésicules intraluminales. La nouvelle structure renfermant ces vésicules intra-luminales est nommée endosome multi-vésiculaire (EMV). Le passage de Met dans l'EMV termine définitivement sa signalisation. En effet, le récepteur Met est physiquement séparé du cytoplasme et ne peut plus être recyclé à la membrane plasmique. Il est dès lors engagé dans la voie de dégradation lysosomale (Tanaka et al., 2008; Trusolino et al., 2010).

L'EMV devient un endosome tardif qui fusionne avec un lysosome, formant un endolysosome. Ce compartiment possède un pH très acide permettant l'activité de nombreuses protéases. De nombreux lipide et protéines sont alors dégradés, y compris le récepteur Met. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs des pompes à protons empêchant l'acidification des lysosomes empêche la dégradation de Met induite par l'HGF/SF (Hammond et al., 2001; Li et al., 2005; Tanaka et al., 2008).

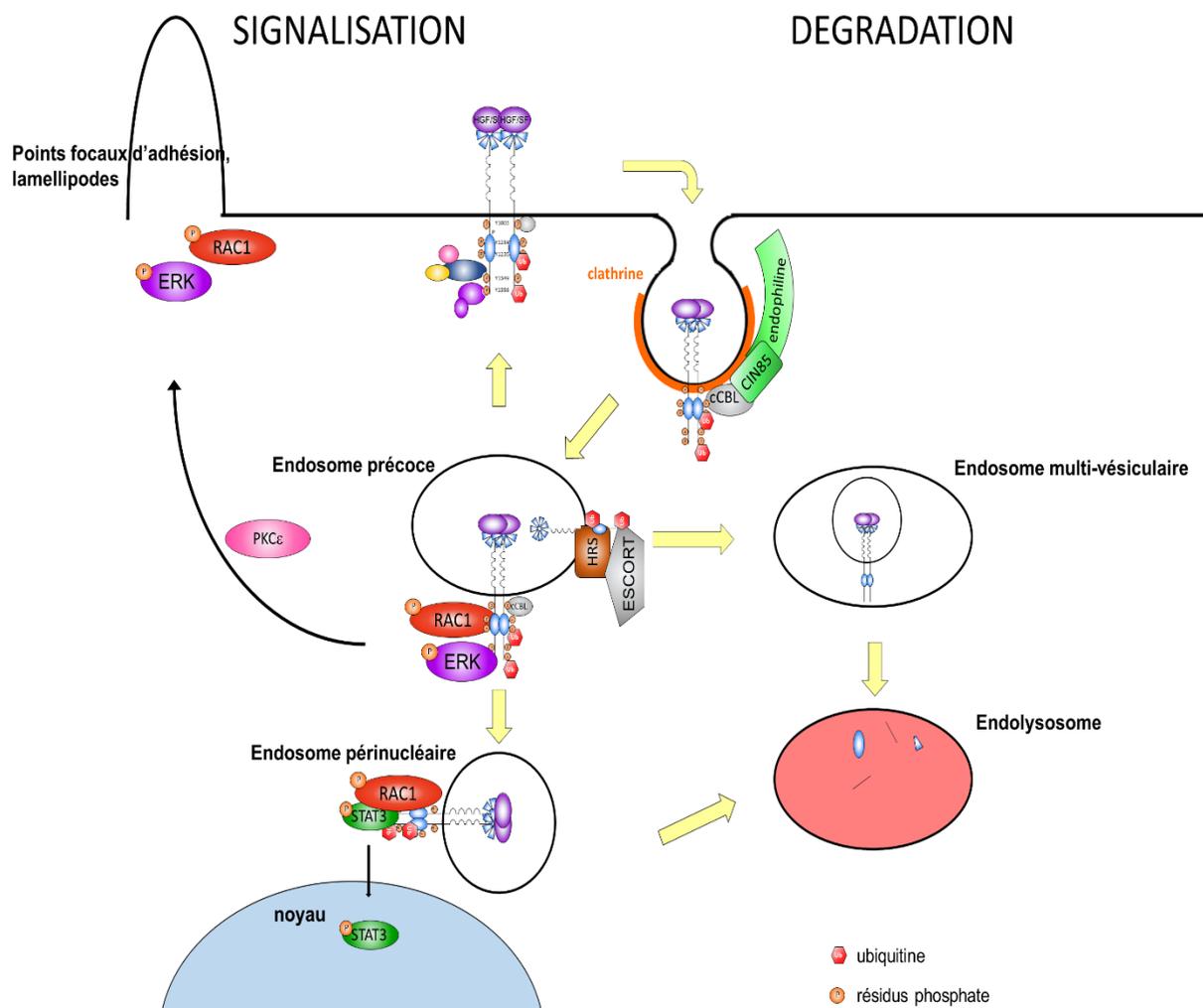


Figure 8 : Rôles de l'internalisation du récepteur Met : recyclage, signalisation et dégradation.

D'après (Lefebvre et al., 2012) et (Barrow-McGee and Kermorgant, 2014)

c. La dégradation de Met par des protéines contenant des régions riches en résidus Leucine

Le récepteur Met possède également comme partenaires quelques protéines contenant des domaines enrichis en résidus Leucine. Ces protéines contrôlent la demi-vie du récepteur en favorisant sa dégradation. De cette façon, elles exercent un contrôle négatif sur la signalisation de Met.

Ainsi, Met interagit avec LRIG1 (Leucin-rich Repeats and ImmunoGlobulin-like domains 1), une protéine transmembranaire de type immunoglobuline également impliquée dans le contrôle de la demi-vie des récepteurs ErbB. L'interaction du récepteur Met et de LRIG1 est indépendante du ligand. Elle n'active pas Met et induit une dégradation faisant intervenir son internalisation dans les lysosomes sans recrutement de cCBL et en l'absence de toute ubiquitination. Le mécanisme exact de ce processus reste à déterminer (Shattuck et al., 2007)

Met peut également se lier à la décorine, un protéoglycan extracellulaire riche en résidus Leucines. La décorine se lie à la région extracellulaire de Met de façon compétitive avec l'HGF/SF et induit son activation partielle : les résidus Y1003, Y1234 et Y1235 sont phosphorylés mais pas les résidus du site de recrutement Y1349 et Y1356. La décorine favorise donc le recrutement de c-CBL, l'ubiquitination et la dégradation de Met par adressage au lysosome sans activer sa signalisation. La décorine favorise également l'élagage de Met, c'est-à-dire son clivage par des métalloprotéases membranaire dans la région bordant la membrane plasmique (Goldoni et al., 2009).

Enfin, Met interagit avec la bactérie *Listeria monocytogenes* par l'intermédiaire de la protéine bactérienne riche en Leucines InIB (internaline B). Cette interaction est cruciale pour l'entrée du pathogène dans les cellules. InIB agit comme un agoniste de Met et induit les mêmes réponses cellulaires que l'HGF/SF. L'activation de Met par InIB induit aussi son ubiquitination par c-CBL et son internalisation dans les endosomes. Met est ainsi adressé à la dégradation par les lysosomes tandis que *Listeria monocytogenes* entre dans les cellules (Shen et al., 2000; Veiga and Cossart, 2005).

d. La dégradation de Met par clivage protéolytique

Le récepteur Met peut également être dégradé par clivage protéolytique. En conditions basales, Met est clivé par des métalloprotéases membranaires de la famille ADAM, générant un fragment soluble dans l'environnement extracellulaire et un fragment cellulaire ancré à la membrane. Ce fragment subit un deuxième clivage par la γ -sécrétase puis une dégradation

par le protéasome. Ce processus, nommé PS-RIP, exerce un contrôle permanent sur la quantité de récepteur Met présent à la surface des cellules (Foveau et al., 2009; Schelter et al., 2010). De manière intéressante, le clivage de Met par les métalloprotéases peut également avoir lieu au sein d'endosomes. Dans ce cas, les produits de clivages de Met sont orientés vers le lysosome où ils sont dégradés (Ancot et al., 2012).

Lors de l'apoptose, le récepteur Met est séquentiellement clivé par les caspases. Ce clivage induit la dégradation du Met pleine longueur, empêchant ainsi sa signalisation et génère un fragment intracellulaire pro-apoptotique (Tulasne et al., 2004; Foveau et al., 2006).

Les clivages protéolytiques du récepteur Met interviennent donc dans une grande variété de situations physiologiques et régulent efficacement son expression. Ces notions seront développées plus loin, dans la partie IV.

Finement contrôlée par un réseau complexe d'effecteurs et de partenaires, la signalisation du couple HGF/SF-Met joue un rôle fondamental dans l'embryogenèse et la régénération tissulaire. Sa dérégulation est observée dans des situations pathologiques comme de nombreux cancers, au cours desquels elle peut conduire à une prolifération anarchique des cellules ou à l'acquisition d'un phénotype invasif.

III. Le couple HGF/SF-Met dans le cancer

Selon Weinberg et Hanahan, la progression tumorale nécessite l'acquisition d'une dizaine de propriétés (Figure 9) (Hanahan and Weinberg, 2011). Les réponses biologiques induites par le récepteur Met, parfois regroupées sous le nom de croissance invasive, correspondent à certaines de ces caractéristiques : prolifération, résistance à l'apoptose, migration et invasion... Ainsi, la suractivation du récepteur Met et des voies de signalisation en aval contribuent souvent au développement de tumeurs et sont associées à un mauvais pronostic (www.vai.org/met).

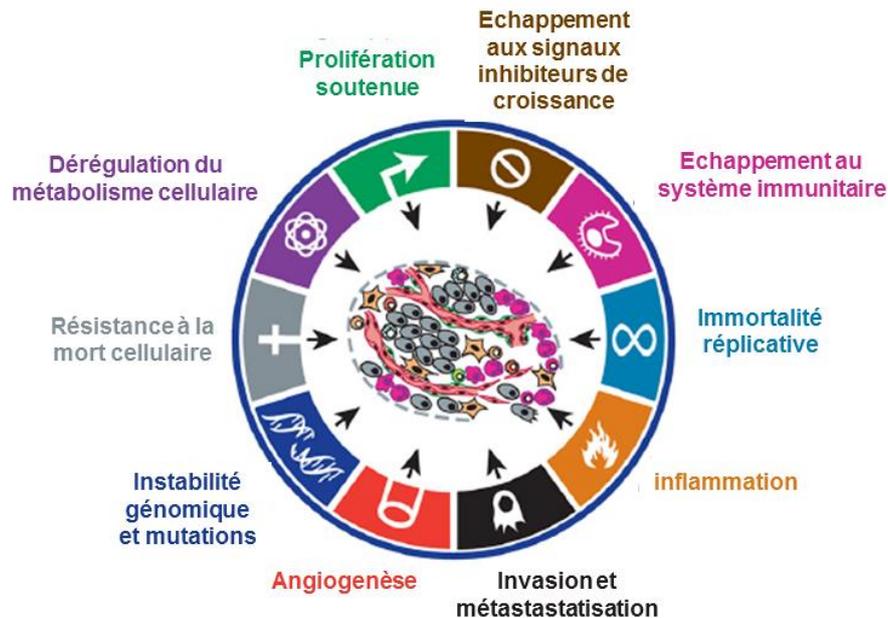


Figure 9 : propriétés des tumeurs
D'après (Hanahan and Weinberg, 2011)

A) De puissants oncogènes

1) Mécanismes de dérégulation : le couple HGF/SF-Met perd le contrôle

a. Mutations de la séquence de Met

La découverte du récepteur Met dans des lignées transformées permet de supposer son possible rôle d'oncogène dès son identification. Cependant, la première preuve formelle à établir un lien entre le récepteur Met et le cancer est l'identification de mutations activatrices au sein du domaine kinase dans des carcinomes papillaires rénaux héréditaires durant la deuxième moitié des années 90 (Jeffers et al., 1997; Schmidt et al., 1997). Depuis, près de 200 mutations de la séquence nucléotidique ont été identifiées selon le site COSMIC (Catalog of Somatic Mutations In Cancer) (Figure 10). Les mutations détectées dans le récepteur Met sont majoritairement des substitutions et des mutations silencieuses. Quelques insertions et délétions ont aussi été répertoriées. Elles sont surtout trouvées dans des cancers du rein, du poumon et des voies aérodigestives supérieures. La majeure partie est répartie dans trois régions spécifiques de Met : la partie extracellulaire, le domaine juxtamembranaire et le domaine kinase. D'autres mutations, moins fréquentes, ont aussi été détectées en dehors de ces trois régions, comme des mutations au niveau de la queue C-terminale de Met.

La majorité des mutations connues du récepteur Met se situent au sein de son domaine kinase. Des mutations germinales et somatiques ont été détectées, principalement dans des

cancers papillaires du rein et des cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) (Schmidt et al., 1997; Di Renzo et al., 2000). Elles présentent une activité transformante sur des cultures de fibroblastes NIH-3T3 *in vitro* et sont tumorigènes dans des modèles de xénogreffe en souris immunodéficientes. De plus, des souris KI pour une version de Met exprimant l'une de ces mutations développent de nombreux cancer de type lymphome, sarcomes, carcinomes (Graveel et al., 2004; Ponzio et al., 2009; Graveel et al., 2009). Les mécanismes d'action d'au moins certaines de ces mutations ont été identifiés et sont variés. Certaines mutations requièrent le ligand pour activer Met et ont surtout pour effet de diminuer le seuil d'HGF/SF nécessaire (1999; Chiara et al., 2003). D'autres mutations permettent une activation constitutive de Met. Par exemple dans le cas de la mutation Y1235D, répertoriée dans environ 10% des cancers des VADS étudiés, l'acide aspartique remplaçant la tyrosine mime l'effet d'une phospho-tyrosine et confère au récepteur Met une activité kinase constitutive. L'activité de cette version de Met est même indépendante de la phosphorylation de la tyrosine Y1234 (Cristiani et al., 2005). Au moins certaines de ces mutations perturbent également la localisation cellulaire de Met : les mutations D1246N et M1268T augmentent les mouvements d'aller-retour de Met entre la membrane plasmique et les endosomes précoces, diminuant l'adressage de Met aux lysosomes et sa dégradation. Par conséquent, le récepteur Met muté s'accumule dans les endosomes. Cette relocalisation semble importante pour l'activité des récepteur Met mutés puisque l'inhibition de l'endocytose inhibe leur activité transformante *in vitro* et *in vivo* (Joffre et al., 2011).

Dans des cohortes de cancer du poumon, d'autres mutations ont été identifiées au sein de la région extracellulaire de Met, notamment dans le domaine Sema (Ma et al., 2003; Jagadeeswaran et al., 2006; Ma et al., 2008). En l'absence d'amplification de l'activité kinase par ces mutations, il a été proposé que celles-ci augmentent l'affinité de Met pour l'HGF/SF. Cependant, la mutation N375S, l'une des plus abondantes, diminue légèrement l'affinité de Met pour son ligand dans un test ELISA (Krishnaswamy et al., 2009). De plus, cette mutation est détectée dans des proportions similaires chez des individus sains et chez des patients atteints de cancer du poumon ou de l'estomac. Elle n'est pas associée à un risque accru de cancer et correspond même à un meilleur pronostic. La mutation N375S serait donc un polymorphisme sans activité transformante (Liu et al., 2012; Shieh et al., 2013). Ces résultats jettent un doute sur l'action transformante supposée des mutations du domaine extracellulaire de Met.

Le domaine juxtamembranaire de Met est impliqué dans le contrôle négatif de son expression. Certaines mutations au sein de ce domaine entraînent une stabilité accrue de Met. En effet, des mutations introniques induisant une délétion de l'exon 14, qui code pour le domaine juxtamembranaire, ont été détectées dans des cancers du poumon ainsi qu'une lignée cellulaire issue de cancer gastrique. La version délétée du récepteur ne possède plus

le site de recrutement de c-CBL (résidu Y1003). Son ubiquitination et sa dégradation sont diminuées et sa signalisation en réponse à l'HGF/SF est accrue, notamment l'activation de la voie des MAPKinases. Ces mutations sont transformantes pour des lignées de fibroblastes (Kong-Beltran et al., 2006; Onozato et al., 2009; Asaoka et al., 2010). Le même type de résultat a été observé pour des substitutions du résidu Y1003 de Met (Peschard et al., 2001; Abella et al., 2005). Ces dernières années, des techniques de séquençage haut débit à partir de vastes cohortes de cancers du poumon ont permis de détecter ce type de mutations, confirmant leur activité transformante (Ding et al., 2008; Imielinski et al., 2012; Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). D'autres mutations ponctuelles ont été identifiées au sein de cohortes de cancers du poumon, de cancers gastriques ou de mélanomes, comme les mutations N945S, R970C, P991S et T992I (Ma et al., 2003; Jagadeeswaran et al., 2006; Ma et al., 2008). La fréquence de ces mutations est assez faible puisqu'elle concerne un ou deux échantillon pour des cohortes de quelques dizaines de patients. En l'absence d'effet direct sur l'activité kinase, il a été proposé que ces mutations soient des polymorphismes de Met (Tyner et al., 2010). Cependant, la xénogreffe à des souris immunodéficientes de NIH-3T3 exprimant les versions mutées P992S et T992I de Met induit la formation d'un plus grand nombre de tumeurs que des NIH-3T3 transfectées par du Met sauvage (Lee et al., 2000). De plus une étude de génétique fonctionnelle a montré que la lignée de souris SWR/J présente une susceptibilité aux cancers du poumon due à la mutation R968C, l'équivalent chez la souris de la mutation R970C (Zaffaroni et al., 2005). Les mécanismes de ces mutations ponctuelles est encore inconnu.

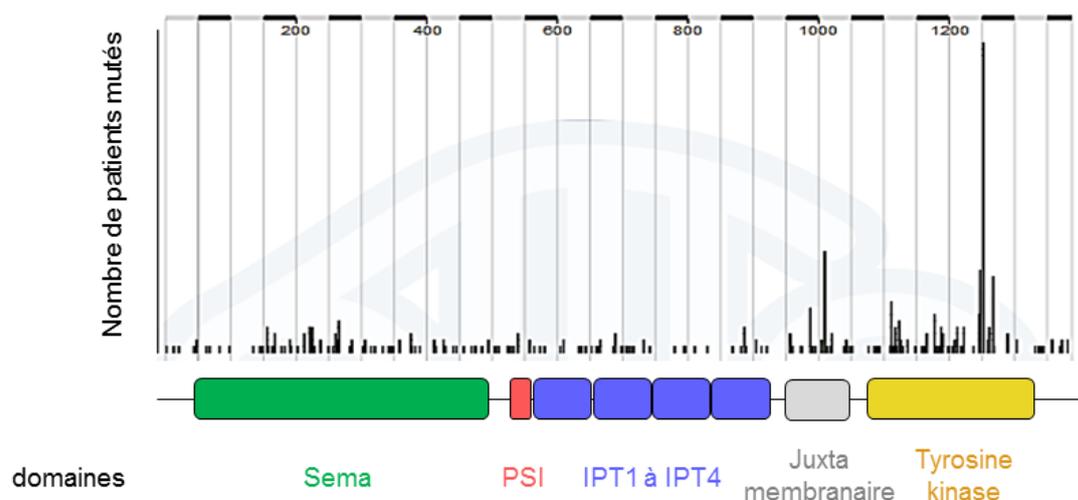


Figure 10 : Mutations de Met identifiées chez l'homme.

Répartition des mutations de Met identifiées chez l'homme le long de sa séquence protéique. D'après le site <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>

b. Surexpression de Met

Malgré un rôle avéré dans la transformation cellulaire, les mutations du récepteur Met ne sont observées dans une proportion des patients assez restreinte (Jeffers et al., 1997; Jagadeeswaran et al., 2006; Ma et al., 2008). La principale dérégulation dans le cancer est la surexpression de récepteur Met, de son ligand ou bien des deux (Figure 11).

Catégorie	Type de cancer	Expression d'HGF/SF	Expression de Met	Mauvais pronostic	Présence de mutations
Carcinomes	vessie	X	X	X	
	sein	X	X	X	X
	cervical	X	X	X	
	cholangiocarcinome	X	X		
	colorectal	X	X	X	
	endomètre	X	X		
	œsophage	X	X	X	
	gastrique	X	X	X	X
	voies aérodigestives supérieurs	X	X	X	X
	rein	X	X	X	X
	foie	X	X	X	X
	poumon	X	X	X	
	nasopharynx	X	X	X	
	ovaire	X	X	X	X
	pancréas et vésicule biliaire	X	X		
	prostate	X	X	X	
thyroïde	X	X	X	X	
sarcomes de l'appareil locomoteur	ostéosarcome	X	X		X
	rhabdomyosarcoma	X	X	X	
	sarcome synovial	X	X	X	
sarcomes des tissus mous	sarcome de Kaposi	X	X		
	sarcome des muscles lisses	X	X	X	
	fibrosarcome	X	X		
hémopathies malignes	leucémie myéloïde aigue	X			
	leucémie à cellules T de l'adulte	X	X	X	
	leucémie myéloïde chronique	X			
	lymphomes	X	X	X	X
	myélomes multiples	X	X	X	
autres tumeurs	glioblastomes/astrocytomes	X	X	X	X
	mélanomes	X	X	X	
	mésothéliomes	X	X	X	
	tumeur de Wilm	X	X		

Figure 11 : Implication du couple HGF/SF-Met dans différents cancers.

Tableau indiquant les types de cancer dans lesquels une surexpression de Met, de l'HGF/SF ou bien des mutations de Met ont été détectées. L'association du couple HGF/SF-Met à un mauvais pronostic est également indiquée. D'après le site <http://www.vai.org/met>.

Illustrée par la Figure 12, la surexpression de Met est détectée dans de nombreux cancers, bien que les proportions varient suivant le type de cancer et l'étude. Par exemple le récepteur Met est surexprimé dans 22% à 70% de cancers du sein (Ghoussoub et al., 1998; Scagliotti et al., 2013), 40 à 70% des cancers gastriques (Teng and Lu, 2013), 60% de cancers pulmonaires non à petites cellules (Ma et al., 2005) et jusqu'à 87% des carcinomes rénaux (Natali et al., 1996). Cette surexpression de Met est associée à un mauvais pronostic (Ghoussoub et al., 1998; Garcia et al., 2007; Peng et al., 2014). Des données expérimentales confirment le lien entre surexpression de Met et tumorigenèse puisque des

souris surexprimant ce transgène développent différents types de tumeurs (Wang et al., 2001; Ponzio et al., 2009).

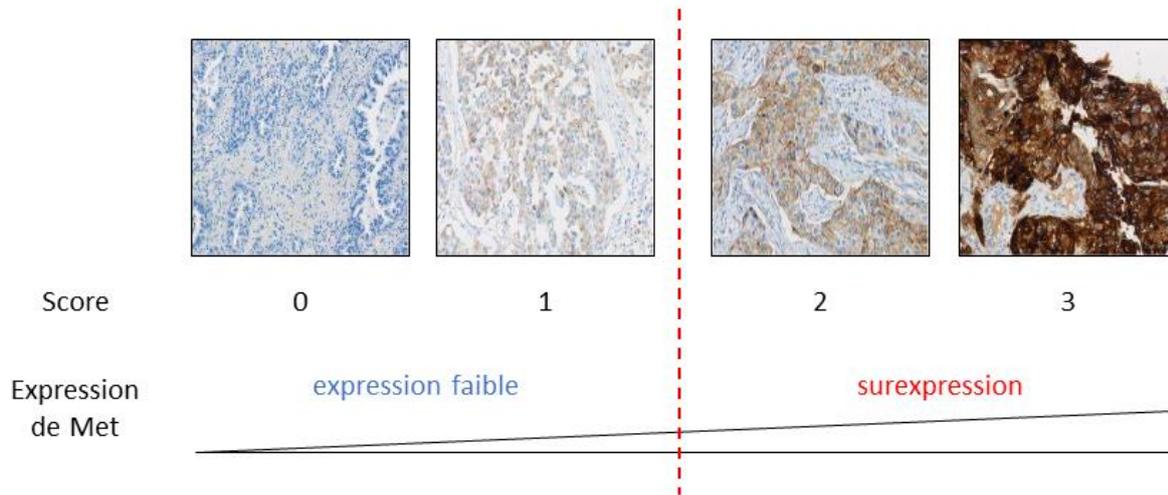


Figure 12 : Intensité de l'expression de Met dans des cancers pulmonaires.
La détection de Met est réalisée par immunohistochimie. Un score allant de 0 à 4 est attribué à chaque échantillon en fonction de l'intensité du marquage et du pourcentage de cellules marquées. Résultats obtenus au sein de l'équipe.

Plusieurs mécanismes peuvent aboutir à la surexpression de Met par les cellules. Dans certains cas, il peut s'agir d'une amplification génique. De nombreuses copies du gène *met* sont ainsi détectables dans des cancers gastriques, des cancers du poumon (Toschi and Cappuzzo, 2010; Kawakami et al., 2014), des cancers colorectaux avec métastases hépatiques (Zeng et al., 2008). Ainsi, la lignée cellulaire GTL-16 possède 11 copies de *met*. Cette amplification entraîne une surexpression du récepteur Met, qui s'active alors en absence de ligand et confère aux GTL-16 des propriétés cancéreuses (Ponzetto et al., 1991; Herrick et al., 2000).

La surexpression du récepteur Met peut également être induite au niveau transcriptionnel. Par exemple l'activation de la voie des MAPKinases par Ras ou la fixation du facteur de transcription ETS1 sur le promoteur de *met* induisent sa transcription. Dans des cellules tumorales, ces deux oncogènes permettent donc la surexpression de Met (Gambarotta et al., 1996; Ivan et al., 1997).

Le taux d'ARN messager (ARNm) de Met est également régulé par certains microARNs (miARN). Les miARNs sont de petits brins d'ARN non codant de 21 à 24 nucléotides. Ils se lient à une séquence spécifique sur le site 3'UTR de leurs ARNm cibles et inhibent leur traduction soit en bloquant directement le processus soit induisant la dégradation des ARNm. Il a été montré que la traduction de Met était inhibée par une classe de miARN les miR-34b et miR34c (Migliore et al., 2008). Il a de plus été montré que p53, un puissant suppresseur de tumeur, induit la transcription des miR34. Ainsi, il semble que l'inactivation

de p53, observée dans plus de la moitié des cancers, peut favoriser l'expression de Met via la perte des miR-34 (Hwang et al., 2011). Ces dernières années, un nombre croissant de miARNs contrôlant l'expression de *met* a été découvert dans divers modèles : miR-31 (Mitamura et al., 2013), miR-34a et miR608 (Zhang et al., 2014a) miR181a 5p (Korhan et al., 2014)... Certains de ces miARNs pourraient avoir une valeur de marqueurs pronostics, comme miR-30b et miR30c (Gu et al., 2013), prédictifs d'une bonne réponse aux inhibiteurs de récepteurs tyrosine kinase dans une cohorte de patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules.

L'interaction du récepteur Met avec des partenaires membranaires peut également moduler son expression. Par exemple la protéine à régions riches en résidus Leucine LRIG1 favorise la dégradation de Met. Ainsi, l'extinction de LRIG1 dans des lignées cancéreuses mammaires augmente la demi-vie du récepteur Met tandis que sa surexpression favorise la dégradation de Met (Shattuck et al., 2007). De plus, la perte d'expression de LRIG1, qui entraîne une surexpression de Met et d'autres RTKs dans des lignées dérivées de MDA-MB231, semble être responsable de la résistance de ces cellules à certains inducteurs d'apoptose (Bai et al., 2012). Il n'existe cependant pas d'étude démontrant l'effet d'une perte de LRIG1 sur l'expression de Met *in vivo*. A l'inverse de LRIG1, la protéine transmembranaire Tensine 4 favorise la stabilisation du récepteur Met. En effet, il a été montré dans des lignées cancéreuses que le récepteur Met activé recrute la Tensine 4 et que cette interaction avec la Tensine 4 limite la dégradation de Met par la voie lysosomale. Ce phénomène est notamment important pour la survie des cellules addictes à Met. De plus, il existe une corrélation entre l'expression de Met et de la Tensine 4 dans des cohortes de cancers du côlon et de cancers ovariens, suggérant que la Tensine 4 participe à la surexpression du récepteur Met *in vivo* (Muharram et al., 2014).

Des facteurs environnementaux comme l'hypoxie contrôlent aussi la stabilité de Met. Au fur et à mesure de la croissance de la tumeur, les zones situées trop loin des capillaires ne captent plus suffisamment de nutriments et d'oxygène. Ces conditions hypoxiques stabilisent la protéine HIF1 α , rapidement dégradée en condition de normoxie. HIF1 α recrute HIF1 β et le dimère transloque dans le noyau, induisant la transcription de gènes cibles capables de contrecarrer l'hypoxie. Les protéines exprimées sont impliquées dans l'angiogenèse comme le VEGF, dans l'érythropoïèse, dans le transport du glucose ou encore dans la survie comme le récepteur Met. Ainsi, la stabilisation de HIF1 α corrèle avec la surexpression du récepteur Met et, grâce à l'induction de réponses de survie et de prolifération, Met permet aux tumeurs de croître malgré les conditions d'hypoxique (Pennacchietti et al., 2003; Scarpino et al., 2004). Cette expression de Met favorise également des disséminations métastatiques grâce aux propriétés pro-migration et pro-invasion de Met. Les réponses cellulaires déclenchées

par l'hypoxie pourraient ainsi expliquer les résultats modestes des thérapies anti-angiogéniques développées dans les années 2000. En effet, des traitements dirigés contre le VEGF ou son récepteur le VEGFR2 ne prolongent la survie des patients que de quelques mois (Loges et al., 2009). Il a été de plus été montré dans des modèles de souris que, si ces thérapies entraînent une régression des tumeurs primaires, elles favorisent le comportement invasif et métastatique des cellules, accélérant la survenue de métastases (Ebos et al., 2009; Pàez-Ribes et al., 2009). La surexpression de Met suite à la stabilisation de HIF-1 α est l'un des mécanismes expliquant cette résistance aux thérapies anti-angiogéniques (Comito et al., 2011; Cooke et al., 2012).

c. Surexpression de l'HGF/SF : autocrinie et paracrinie

La surexpression de l'HGF/SF est détectée dans le stroma ou le sérum de patients atteints de nombreux cancers comme des cancers du poumon (Siegfried et al., 1997), du côlon (Toiyama et al., 2009), de l'estomac (Niki et al., 1999) ou encore du sein (Yamashita et al., 1994; Toi et al., 1998) (Figure 12). Cette surexpression est souvent associée à un phénotype plus agressif et un mauvais pronostic. La surexpression conjointe de Met et de l'HGF/SF, souvent observée des cohortes de patients (La Rosa et al., 2000; Tachibana et al., 2012), a également un fort potentiel tumorigène.

Du point de vue expérimental, le rôle transformant de l'HGF/SF a été démontré *in vivo* puisque des souris transgéniques surexprimant l'HGF/SF dans tous l'organisme développent spontanément de nombreux cancers de type carcinome, mélanome ou sarcome (Takayama et al., 1997) et que des souris surexprimant l'HGF/SF spécifiquement dans les glandes mammaires développent des cancers mammaires après plusieurs gestations (Gallego et al., 2003). De plus, l'implantation de lignées cancéreuses humaines exprimant le récepteur Met chez des souris exprimant l'HGF/SF humain induit une augmentation de la tumorigénicité (Zhang et al., 2004).

Il semblerait que l'action de l'HGF/SF sur Met puisse parfois être autocrine. Bien que cette caractéristique soit difficile à mettre en évidence chez des patients par ImmunoHistoChimie (IHC) à cause du manque de résolution de cette technique, il a été montré que quelques lignées cellulaires cancéreuses expriment à la fois le récepteur Met et son ligand (Ferracini et al., 1995; Park et al., 2005). Cependant, dans la plupart des cas, l'action de l'HGF/SF est paracrine, le facteur de croissance étant produit par les cellules du stroma : les cellules vasculaires (musculaires lisses et endothéliales), des cellules immunitaires (neutrophiles et macrophages) mais surtout les fibroblastes associées aux cancers (FACs), des fibroblastes modifiés du stroma qui favorisent la progression tumorale. De plus, les cellules cancéreuses

peuvent produire des facteurs qui favorisent la production d'HGF par les FACs, créant une boucle de renforcement positif. Ces facteurs sont principalement l'interleukine-1 β (IL-1 β), le Fibroblast Growth Factor b (FGFb), le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), le Transforming Growth Factor α (TGF- α) et la prostaglandine E2 (PGE2). L'augmentation de la production d'HGF/SF n'est cependant pas leur seul effet. En effet, ces cytokines induisent également des réponses cellulaires comme l'angiogenèse, la réponse inflammatoire et la prolifération (Jiang et al., 1999; Matsumoto and Nakamura, 2006).

d. Notion d'addiction à Met

La signalisation de certains oncogènes peut devenir prédominante, voire indispensable pour des cellules tumorales. Leur inhibition par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou de siRNAs (small interfering RNA) empêche alors la prolifération des cellules et peut également conduire à leur mort (Weinstein and Joe, 2008). On parle alors d'addiction des cellules à un oncogène. Dans les années 2000, certaines lignées cancéreuses présentant ce type de dépendance à Met sont identifiées. En effet, de faibles doses de l'inhibiteur pharmacologique de Met PHA665752 induit dans ces lignées un arrêt de prolifération et une apoptose massive (Smolen et al., 2006). Ces lignées sont peu nombreuses : un criblage de lignées épithéliales avec le PHA665752 montre que 7 lignées sur 500 sont addictes à Met et que, pour une douzaine de lignées supplémentaire, Met joue un rôle important. Les lignées identifiées comme addictes à Met présentent toute une amplification du gène *met*, suggérant un lien entre ce type de dérégulation et l'addiction à Met (Figure 13) (McDermott et al., 2007). De manière intéressante, ces cellules sont principalement des lignées gastriques et pulmonaires, deux types de cancers sur lesquels se concentrent les nouvelles thérapies ciblant Met (Scagliotti et al., 2013). Une analyse des voies de signalisation dans ces lignées montre que l'addiction à Met repose principalement sur les voies MAPKinase et PI3K/Akt. En effet, l'inhibition de Met entraîne leur inactivation. A l'inverse, l'activation constitutive de chacune de ces voies permet de compenser l'inhibition de Met (Bertotti et al., 2009).

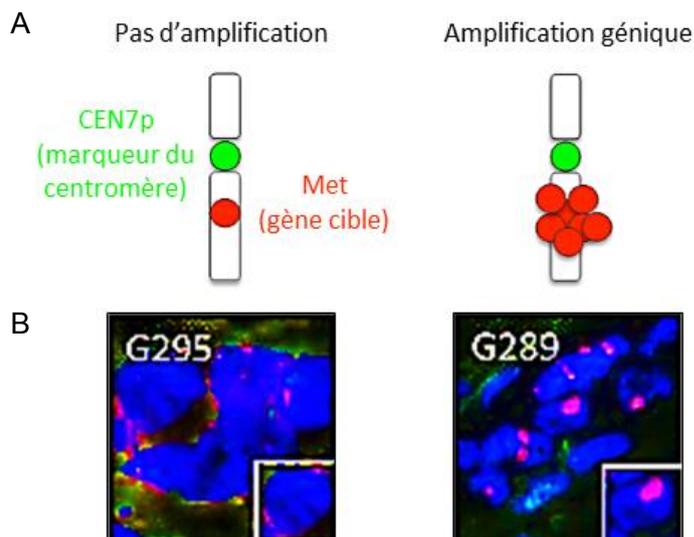


Figure 13 : Détection d'une amplification génique de Met par FISH

A – La détection d'une amplification génique se fait par FISH dans des lignées cellulaires ou des coupes de tumeurs. Le nombre de copie du gène d'intérêt par cellules est calculé grâce à une sonde fluorescente et parfois ramené au nombre de centromère du chromosome par cellules. D'après (Kawakami et al., 2014). B – Exemples de coupes de tumeurs gastriques sans (G295) ou avec (G289) amplification génique de Met, analysées par FISH. D'après (Kawakami et al., 2013).

e. Interactions avec d'autres récepteur tyrosine kinase

Si certaines lignées sont addictes à Met, la transformation cellulaire requiert généralement la dérégulation de plusieurs oncogène. De manière intéressante, il a été montré que, dans certaines lignées cellulaire, le récepteur Met interagit avec d'autres RTKs membranaires. Ainsi, l'ajout d'HGF/SF ou l'activation constitutive de Met permet d'activer les récepteur Ron, EGFR et ErbB3 indépendamment de leur ligand et d'activer le récepteur orphelin ErbB2. L'utilisation d'inhibiteurs de Met permet alors d'inhiber l'activation de ces récepteurs. A l'inverse, le récepteur Met peut être activé en l'absence de son ligand suite à l'ajout d'EGF et/ou TGF α (ligands de l'EGFR), du MSP (Macrophage Stimulating Protein, ligand de Ron), du GDNF (Glial cell Derived Neurotrophic Factor, ligand de Ret et de GFR α 1) ou de l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1, ligand de l'IGFR) (Follenzi et al., 2000; Jo et al., 2000; Popsueva et al., 2003; Varkaris et al., 2013). Le récepteur Met peut également être activé en l'absence de son ligand par des cellules exprimant une forme constitutivement active de l'EGFR (Huang et al., 2007).

Ces dialogues entre récepteurs membranaires sont un important médiateur de la transformation cellulaire. Par exemple la co-expression de Met et Ron dans des lignées ovariennes favorise les réponses d'invasion (Maggiara et al., 2003). Il a aussi été montré que l'activation de Met convertit la réponse de morphogénèse émise par ErbB2 en signal d'invasion (Khoury et al., 2005). Finalement, dans certaines lignées issues de cancer du

sein, des inhibiteurs de l'EGFR peuvent contrecarrer les réponses à l'HGF/SF, soulignant l'importance de l'EGFR dans le relais de la signalisation de Met (Bonine-Summers et al., 2007).

Les mécanismes sur lesquels reposent ces dialogues à l'heure actuelle n'ont pas été clairement identifiés. Le cas le plus étudié est l'interaction entre le récepteur Met et l'EGFR. Une interaction directe entre les deux récepteur a été détectée dans des lignées issues de carcinomes de l'épiderme ou de cancers du poumon, suggérant la formation d'hétérodimères permettant la trans-phosphorylation puis l'activation de Met et de l'EGFR (Jo et al., 2000; Guo et al., 2008). D'autres données indiquent que l'activation de Src par Met permet d'activer l'EGFR. S'il a d'abord été suggéré que Src puisse permettre l'activation de l'EGFR sans interaction directe entre Met et l'EGFR (Mueller et al., 2008), il a depuis été montré, dans une lignée tumorale mammaire, que la colocalisation de ces trois protéines au sein d'un même complexe est nécessaire à l'activation de Met en l'absence de ligand (Mueller et al., 2010). Un autre mécanisme d'activation indirecte de l'EGFR par Met est que l'activation de Met peut favoriser la production d'hB-EGF, un ligand de l'EGFR (Reznik et al., 2008).

2) Implication du couple HGF/SF-Met dans les métastases

Les dérégulations du couple HGF/SF-Met, comme la surexpression ou la présence de mutations activatrice, sont souvent observées dans les tumeurs primaires (Ghoussoub et al., 1998; Ma et al., 2005; Toiyama et al., 2009). Cependant, le couple HGF/SF-Met est aussi impliqué dans les étapes ultérieures au développement des tumeurs primaires, notamment l'angiogenèse tumorale et la formation de métastases.

En effet, dans certaines cohorte de patients, comme des cohortes de cancers gastriques (Amemiya et al., 2002) ou des voies aérodigestives (Cortesina et al., 2000), l'expression de Met corrèle avec la survenue de métastases. Dans des cas de cancers des voies aérodigestives, une étude montre que l'expression de l'HGF/SF est fortement augmentée au niveau de sites métastatiques (Uchida et al., 2001). Du point de vue expérimental, l'injection orthotopique de cellules de carcinomes pulmonaires exprimant à la fois Met, l'HGF/SF ou bien les deux génère un plus grand nombre de métastases que l'injection de cellules contrôles (Yamashita et al., 1994; Moshitch-Moshkovitz et al., 2006; Navab et al., 2009). De manière intéressante, une mutation ponctuelle du site de recrutement multi-substrats empêchant le récepteur Met de lier d'autres partenaires que Grb2 abolit son potentiel métastatique *in vivo*, suggérant que le son fonctionnement est essentiel à ses propriétés métastatiques. Il semblerait que Rac1, impliqué dans le contrôle du cytosquelette et la

migration de cellules, soit nécessaire à l'effet métastatique de Met (Ridley et al., 1995; Ferraro et al., 2006; Ménard et al., 2014).

3) Implication du couple HGF/SF-Met dans les résistances aux thérapies ciblées actuelles

Malgré un arsenal thérapeutique toujours plus étoffé, de nombreux cancers restent associés à une forte mortalité, notamment à cause de la capacité des cellules tumorales à résister aux traitements actuels. Un grand nombre d'études a récemment montré l'implication du récepteur Met dans les phénomènes de résistance aux traitements (Corso and Giordano, 2013).

a. L'activation autonome de Met au sein de cellules cancéreuses

En plus d'être de mauvais pronostic dans de nombreux cancers, le récepteur Met favorise la résistance aux agents chimiothérapeutiques comme le cisplatine dans des lignées de cancers du poumon ou d'ostéosarcomes. En effet, dans des lignées cellulaires issues de cancers pulmonaires, l'HGF/SF entraîne une diminution de l'expression de la protéine pro-apoptotique AIF et favorise la survie des cellules au cisplatine. L'extinction de FAK dans ces cellules restaure leur sensibilité au cisplatine, montrant que ce phénotype repose au moins en partie sur cette voie de signalisation (Chen et al., 2008). Dans des lignées d'ostéosarcomes surexprimant Met, l'inhibition du récepteur sensibilise également les cellules au cisplatine bien que, dans ces cellules, ce phénomène repose sur la voie PI3K/Akt (Wang et al., 2012).

L'implication du récepteur Met dans les résistances aux thérapies ciblées a également été très étudiée. Ainsi, une amplification du gène *met* est constatée dans 5% à 20% des patients atteints de cancers du poumon traités au gefitinib, un inhibiteur de l'EGFR (Bean et al., 2007; Engelman et al., 2007; Arcila et al., 2011; Yu et al., 2013). Cette amplification génique est également détectée dans une lignée issue de cancers du poumon résistante au gefitinib. Elle induit une surexpression de Met déclenchant l'activation constitutive d'ErbB3 qui active lui-même la voie PI3K/Akt. L'inhibition de Met restaure la sensibilité de ces cellules au gefitinib (Engelman et al., 2007). Des résultats récemment obtenus dans notre laboratoire montrent que la surexpression de Met dans cette lignée, en plus de compenser l'inhibition de l'EGFR, accroît les capacités de migration et de croissance sans ancrage des cellules. Ces résultats suggèrent que les thérapies ciblées, si elles permettent d'endiguer la progression tumorale

dans un premier temps, pourraient exercer au sein des tumeurs une pression sélectionnant les cellules les plus agressives et favoriser un retour de flamme.

Met induit également la résistance de certains cancers du sein aux anticorps ciblant le récepteur ErbB2. En effet, une augmentation du nombre de copies du gène *met* est associée, dans une cohorte de patients, à un plus fort taux d'échec du traitement et une progression plus rapide (Minuti et al., 2012). Au niveau protéique, la surexpression du récepteur Met induit la résistance de lignées cellulaires au trastuzumab (Shattuck et al., 2008). Une amplification de *met* est aussi impliquée dans le développement de résistances aux anticorps dirigés contre l'EGFR chez des patients atteints de cancers du côlon (Bardelli et al., 2013). Enfin, dans un modèle murin de glioblastome multiforme dont la progression dépend de l'EGFR, une surexpression de Met induit une activation de la voie PI3K/Akt impliquée dans la résistance aux inhibiteurs de l'EGFR (Jun et al., 2012).

b. L'activation de Met par le stroma

Si de nombreuses études se sont focalisées sur les mécanismes permettant aux cellules cancéreuses d'acquérir elles-mêmes la résistance aux agents thérapeutiques, la notion que le micro-environnement tumoral, connu pour être tumorigène, peut également induire la résistance aux thérapies est en train d'émerger (Corso and Giordano, 2013). Un des mécanismes expliquant ce rôle du micro-environnement tumoral est la sécrétion de facteurs de croissance. Ainsi, dans le cas de cancers pulmonaires éligibles au traitement ciblant l'EGFR, plusieurs études ont montré qu'un taux élevé d'HGF dans la tumeur ou le plasma corrélait avec une absence de réponse ou l'acquisition de résistances (Tanaka et al., 2011; Yano et al., 2011). En accord avec ces observations, l'ajout d'HGF/SF à des lignées cancéreuses pulmonaires induit leur résistance aux agents anti-EGFR (Yano et al., 2008). L'ajout d'HGF/SF induit également une résistance aux anti-EGFR ou aux anti-ErbB2 dans des lignées de cancers du sein, de l'estomac, ou du côlon (Corso and Giordano, 2013).

Phénomène connu depuis plus longtemps, les conditions hypoxiques rencontrées au sein d'une tumeur mal vascularisée favorisent l'émergence de résistances aux thérapies ciblées. Comme précédemment expliqué, la stabilisation de HIF-1 α en absence d'oxygène entraîne une plus forte expression de Met qui, en favorisant l'angiogenèse et le comportement métastatique des cellules, participe au contournement des traitements anti-angiogéniques actuels (Cooke et al., 2012). Cette surexpression de Met peut être complétée par une forte expression de l'HGF/SF dans le stroma, qui corrèle également avec une résistance aux thérapies ciblant l'angiogenèse (Shojaei et al., 2010).

B) HGF/SF et Met, des cibles thérapeutiques

Le fort potentiel tumorigène du couple HGF/SF-Met en fait une cible thérapeutique de choix. Dès les années 2000, de nombreux laboratoires développent des agents ayant pour but de perturber la signalisation de Met dans le cancer. Ceux-ci peuvent être divisés en plusieurs catégories : des antagonistes de Met, des anticorps bloquants perturbant l'interaction HGF/SF-Met ou des Inhibiteurs de l'activité Tyrosine Kinase (ITKs) de Met (Figure 14).

De tels agents thérapeutiques doivent respecter certains critères afin de pouvoir être administrés aux patients. Par exemple ils doivent apporter une amélioration de la survie ou de l'état général des patients par rapport aux thérapies déjà existantes, ne doivent pas provoquer d'effets secondaires mettant en jeu la vie de patients et doivent de préférence être administrables par voie orale. De très nombreux composés sont actuellement en développement, généralement au stade pré-clinique ou en phase I d'essai clinique. Les plus avancés sont actuellement évalués en phase II ou III d'essai clinique. Il en existe une vingtaine (Figure 15). De nombreux protocoles différents sont testés, reposant sur une monothérapie ou l'association entre ces nouveaux agents et d'autres thérapies ciblées ou chimiothérapies. Leur action est plus particulièrement évaluée contre les cancers du poumon, les hépatocarcinomes, les cancers gastriques, colorectaux, du système nerveux et les cancers du sein (Scagliotti et al., 2013; Montagne et al., 2014).

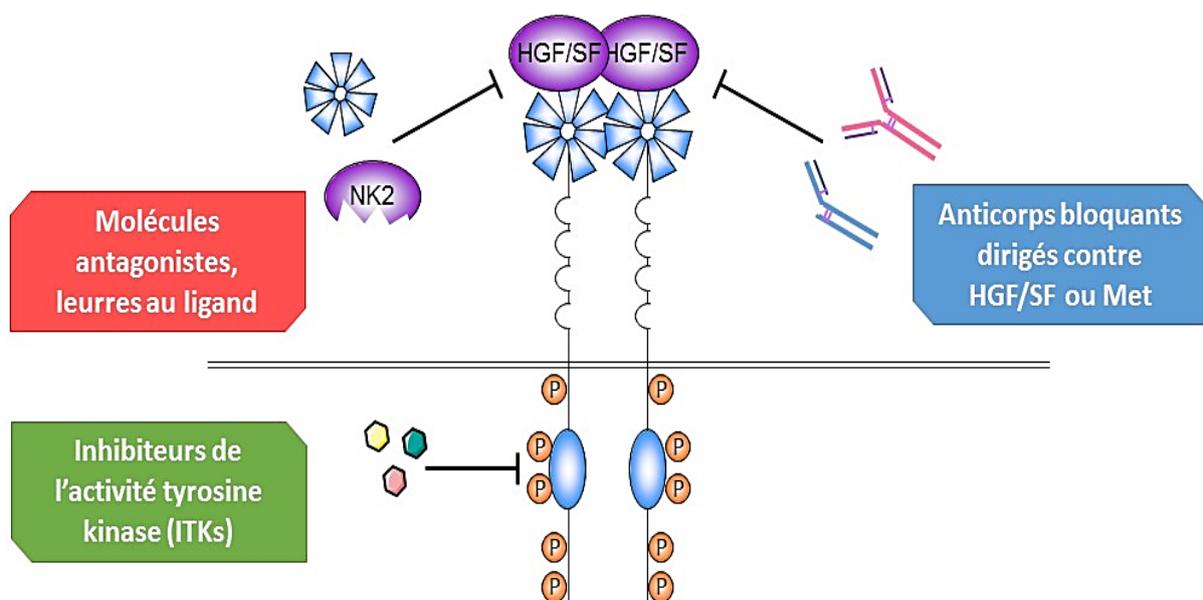


Figure 14 : stratégies d'inhibition du couple HGF/SF-Met dans les cancers

1) Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de Met

Les ITKs sont des petites molécules perméables à la membrane. La grande majorité d'entre eux sont des mimétiques de l'ATP, qui se logent dans la poche ATP du domaine kinase et en empêchent l'accès, bloquant le récepteur dans une conformation inactive (Scagliotti et al., 2013).

Le premier inhibiteur de Met est le K252a, un analogue à la staurosporine, ($IC_{50}=30nM$) et date du début des années 2000 (Morotti et al., 2002). D'autres inhibiteurs plus spécifiques du récepteur Met sont rapidement conçus, comme le SU11274 ($IC_{50}=20nM$) et le PHA665752 ($IC_{50}=9nM$) (Christensen et al., 2003; Sattler et al., 2003) Ces derniers sont encore utilisés en recherche fondamentale à l'heure actuelle. D'autres ITKs ont été développés présentant une meilleure affinité pour Met avec un IC_{50} inférieur au nanomolaire et permettant une meilleure tolérance. Une douzaine d'entre eux sont actuellement en phase d'essai clinique (Scagliotti et al., 2013).

Parmi les inhibiteurs dont le développement est le plus avancé, il est possible de citer le tivantinib (ARQ 197), le cabozantinib (XL184) et le crizotinib. Le tivantinib se lie au domaine kinase de Met et le maintient dans une conformation inactive de façon non compétitive à l'ATP (Eathiraj et al., 2011). Dans des essais précliniques, le tivantinib inhibe de manière efficace la survie et induit l'apoptose de lignées addictes à Met et, dans des expériences de xénogreffes de ces lignées, inhibe la croissance des tumeurs primaires ainsi que la formation de métastase (Munshi et al., 2010; Previdi et al., 2012). Son efficacité a aussi été démontrée dans des essais de phases II : en association avec l'inhibiteur de l'EGFR gefitinib chez des patients atteints de cancers pulmonaires non à petites cellules, il apportait une meilleure survie sans progression et une meilleure survie globale, principalement chez les patients surexprimant le récepteur Met (Sequist et al., 2011). L'étude de phase III menée chez ce même type de patients n'a cependant pas confirmé cette observation et a été arrêtée prématurément car, lors de l'évaluation intermédiaire, il est apparu que les objectifs de survie globale ne seraient pas atteints (Scagliotti et al., 2012). En monothérapie de seconde ligne chez des patients atteints d'hépatocarcinomes, le tivantinib augmente également la survie globale chez les patients surexprimant Met (Santoro et al., 2013). Sa potentielle efficacité est actuellement évaluée dans une étude de phase III.

Le cabozantinib et le crizotinib sont des inhibiteurs présentant une affinité pour plusieurs RTKs. Ces inhibiteurs, dits multi-cibles, sont les seuls ITKs dirigés contre Met dont la prescription a été autorisée à l'heure actuelle. Suite à une évaluation de phase III, le cabozantinib, qui cible Met, le VEGFR2 et Ret, a été autorisé par la FDA (Food and Drug Administration) dans le traitement des carcinomes médullaires de la thyroïde de stade avancé

ou métastatiques (Schoffski et al., 2012; Nix and Braun, 2014). Dans ce cas précis, il est possible que son efficacité soit principalement due à son action contre Ret. Cependant, l'efficacité du cabozantinib dans des expériences de xénogreffes ou des animaux transgéniques semble surtout provenir de sa capacité à bloquer le VEGFR2 et Met en même temps. Cette action permettrait d'inhiber efficacement et simultanément l'angiogenèse et la formation de métastases (Yakes et al., 2011; You et al., 2011; Xiang et al., 2014). L'efficacité du cabozantinib contre plusieurs types de cancers solides est actuellement évaluée dans un essai de phase II (Scagliotti et al., 2013). Élément susceptible de limiter son utilisation, il cause de sévères effets secondaires chez certains patients, notamment des perforations du tractus digestif et des hémorragies (Parikh et al., 2014). Le crizotinib, quant à lui, est un inhibiteur de Met et d'ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase). Il est actuellement recommandé dans le traitement des cancers non à petites cellules avec un réarrangement de ALK mais quelques études de cas récentes suggèrent qu'il pourrait aussi apporter un bénéfice aux patients présentant une signalisation de Met dérégulée. En effet, une réponse au crizotinib a été observée dans un cas de cancer du poumon non à petites cellules sans réarrangement d'ALK mais avec une amplification du gène *met* ainsi que dans des cas de cancers œsophagiens présentant eux aussi une amplification de *met* (Ou et al., 2011). Ainsi, la pluralité des cibles de ces ITKs pourrait expliquer leur efficacité : en plus d'être utilisables contre plusieurs oncogène, ils pourraient empêcher le développement de certaines résistances.

2) Les anticorps monoclonaux

La mise au point d'anticorps monoclonaux (Mab pour « mouse antibody ») ciblant Met ou l'HGF/SF et inhibant l'interaction entre le récepteur et son ligand est une autre stratégie en cours d'évaluation.

Les anticorps monoclonaux présentent plusieurs avantages. En effet, ils ont une grande spécificité pour leur antigène et certains d'entre eux favorisent une réaction immunitaire de l'hôte contre les cellules tumorales. Contrairement aux ITKs, ils sont insensibles au phénomène de résistance multi-drogue qu'acquière de nombreuses cellules tumorales grâce à l'expression de pompes membranaires capables d'exclure les médicaments du cytoplasme. Ils requièrent par contre que leur antigène soit fortement exprimé (Vigna and Comoglio, 2014). De plus, certains anticorps peuvent avoir une pénétrance assez faible des tumeurs : il a par exemple été montré pour des anticorps dirigés contre ErbB2, que certains d'entre eux ne pénètrent pas à l'intérieur des tumeurs en raison de leur très haute affinité pour l'épitope, qui induit leur liaison immédiate, leur internalisation et leur dégradation par les

cellules en périphérie de la tumeur (Rudnick et al., 2011). De façon générale, ces anticorps sont des formes monovalentes (ne possédant qu'un seul bras et ne fixant donc qu'une molécule), afin de prévenir une dimérisation du récepteur parfois observée en présence d'anticorps bivalents (Prat et al., 1998; Martens et al., 2006; Pacchiana et al., 2010). Beaucoup de ces anticorps sont humanisés afin d'éviter une réaction allergique et d'augmenter leur durée de vie au sein de l'organisme (Ahmadzadeh et al., 2014).

Les anticorps monoclonaux présentent une certaine diversité de mécanismes d'action. En effet, certains se fixent à l'HGF/SF pour empêcher sa liaison au récepteur tandis que d'autres fixent le récepteur Met pour bloquer son association avec le ligand. De manière originale, certains anticorps, comme le DN30, se fixent à Met et induisent sa dégradation. A l'heure actuelle, la possibilité d'une synergie entre ces différents mécanismes est une hypothèse intéressante mais qui n'a pas encore été démontrée (Vigna and Comoglio, 2014). Les anticorps les plus avancés dans leur développement sont l'onartuzumab (MetMab) et le rilotumumab (AMG102). Le DN30 reçoit également une attention particulière.

L'onartuzumab (aussi appelé 5D5 ou MetMab) est un anticorps humanisé monovalent fixant le récepteur Met et empêchant la liaison de l'HGF/SF. Son efficacité a été prouvée lors de tests précliniques dans des modèles de cancers du pancréas ou de glioblastomes surexprimant Met (Jin et al., 2008; Martens et al., 2006). Une étude de cas observe même la réponse complète et durable induite par l'onartuzumab d'une patiente atteinte d'un cancer gastrique avec une polysomie de Met (Catenacci et al., 2011). Un test de phase II a été mené pour étudier l'effet de l'onartuzumab en association avec le géfinitib chez des patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules. Malgré des résultats précliniques prometteurs, l'onartuzumab n'apporte aucune amélioration aux patients pris dans leur ensemble. Cependant, une analyse approfondie de sous-populations de patients montre qu'il améliore la survie des patients surexprimant Met (Met^{high}) mais diminue la survie des patients qui ne surexpriment pas Met (Met^{low}) (Spigel et al., 2013; Koeppen et al., 2014). Une étude de phase III visant à confirmer ce possible effet de l'onartuzumab chez les patients Met^{high} a été lancée mais récemment arrêtée en raison d'un manque d'effet de l'onartuzumab (Spigel et al., 2014).

Le rilotumumab (AMG 102) est dirigé contre l'HGF/SF. Il a notamment montré son efficacité, en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques, contre des xénogreffes de lignée U-87, qui produisent l'HGF/SF et activent leur récepteur Met de façon autocrine (Jun et al., 2007). Le rilotumumab a aussi été testé dans plusieurs essais de phase II. Il a montré une capacité à augmenter la survie globale, en association avec une chimiothérapie, dans des cancers gastriques ou de la jonction oesophagienne (Oliner et al., 2012). Il est par contre inefficace pour d'autres types de cancers comme des carcinomes rénaux ou des

glioblastomes (Schöffski et al., 2011; Wen et al., 2011). Comme l'onartuzumab, le rilotumumab n'augmente la survie globale que des patients Met^{high} et, au contraire, diminue la survie globale des patients Met^{low}. Une étude de phase III est actuellement en cours chez des patients atteints de cancers gastriques et de la jonction oesophagienne surexprimant Met (Scagliotti et al., 2013).

Le DN30 est l'un des premiers anticorps développés, dès 1998. Initialement bivalent, il est tout d'abord décrit comme un agoniste partiel de Met, favorisant sa dimérisation, sa phosphorylation et une partie des réponses biologiques de Met comme la dispersion (Prat et al., 1998). Cependant, le DN30 inhibe les réponses d'invasion et de croissance sans ancrage induites par l'HGF/SF au sein de lignées cellulaires cancéreuses et limite la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe de cellules addictes à Met (Petrelli et al., 2006). Le DN-30 agit en se liant à Met et en favorisant sa dégradation par les clivages de type PS-RIP (voir partie IV). Une forme monovalente du DN30 a été développée afin d'empêcher le phénomène d'activation partielle de Met. Cette propriété augmente encore son efficacité. En effet, dans des lignées cancéreuses addictes à Met, le DN30 inhibe l'activité de Met, induit un arrêt dans le cycle cellulaire, favorise l'apoptose et réduit la capacité de croissance sans ancrage des cellules. Dans des expériences de xénogreffe de ces lignées en souris, le DN30 induit une régression des tumeurs quand il est injecté de façon intratumorale ou dans l'organisme entier par injection intrapéritonéale (Pacchiana et al., 2010). Dans des lignées de cancer du poumon ou de glioblastome infectées avec une version inducible tet-on du gène codant pour le DN30, l'activation de la transcription du gène inhibe également les propriétés tumorales des cellules *in vitro* et *in vivo*. Ces dernières expériences pourraient ouvrir la voie à des thérapies géniques impliquant le DN30, une stratégie d'administration qui pourrait permettre de contourner le problème de courte durée de vie du DN30 dans l'organisme (Vigna et al., 2014). L'intérêt du DN30 est de permettre la dégradation du récepteur Met et donc l'inhibition de sa signalisation, qu'elle soit due à l'HGF/SF ou à d'autres mécanismes comme la présence de mutations activatrices ou l'activation du récepteur Met par des partenaires membranaires (Vigna and Comoglio, 2014).

Type	Nom	Compagnie	Cible	Phase I/II	Phase III	Approbation pour utilisation clinique
inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase dirigés contre Met	AMG-208	Amgen		X		
	AMG-337	Amgen		X		
	BMS-777607	Bristol-Myer Squibbs		X		
	Compound 1	Amgen		X		
	EMD 1214063 /EMD 1204831	EMD Serono		X		
	golvatinib (E7050)	Esai	Met	X		
	INC280	Novartis		X		
	JNJ38877605	Johnson & Johnson		X		
	MK-2461	Mecrk		X		
	PF4217903	Pfizer		X		
	Tivantinib (ARQ 197)	ArQule		X	X	
inhibiteurs de l'activité kinase multi-cibles	Amuvatinib (MP470)	Astex Pharmaceutical	Met, Ret, Kit, PDGFR, Flat3	X		
	Cabozantinib (XL184)	Exelixis	Met, Ret, VEGFR2	X	X	Cancer médullaires de la thyroïde avancés/métastatiques
	Crizotinib	Pfizer	Met, ALK	X	X	Cancer du poumon non à petites cellules avec réarrangement de ALK
	Foretinib (XL880)	GlaxoSmithKline	Met, VEGFR1, Ron, Axl	X		
	LY 2801653	Eli Lilly	Met, MST1R, FLT3, Axl...	X		
	MGCD265	MethylGene	Met, Ron, Tie2, VEGFR 1, 2 et 3	X		
anticorps monoclonaux	Ficlatuzumab	Aveo Pharmaceuticals	HGF	X	X	
	LY 2875358	Eli Lilly	Met	X		
	Onartuzumab (MetMab)	Genentec	Met	X	X	
	Rilotumumab (AMG102)	Amgen	HGF	X	X	
	TAK-701	Millenium Pharmaceutical	HGF	X		

Figure 15 : Principaux inhibiteurs de Met actuellement en phase d'essai clinique
D'après (Scagliotti et al., 2013) et (Montagne et al.)

3) Les antagonistes de Met et les leurres aux ligands

Une dernière approche thérapeutique consiste en la synthèse de molécules biologiques capables d'inhiber la liaison de l'HGF/SF à Met. Bien que certaines aient montré une efficacité dans des modèles précliniques comme des xénogreffes de cellules dont les propriétés tumorigènes reposent sur la signalisation de Met, leur efficacité n'est pas évaluée dans des essais cliniques à l'heure actuelle.

a. Les antagonistes de Met

Certaines molécules s'inspirent de variants naturels de l'HGF/SF. Par exemple le NK2, d'abord identifié dans le placenta, ne comprend que le domaine N et les deux premiers domaines kringle. Le NK2 est généré par épissage alternatif de l'ARNm de l'HGF/SF et agit comme un antagoniste de Met, se fixant à Met mais empêchant son activation (Miyazawa et al., 1991; Chan et al., 1993). En effet, la présence du domaine K2 maintient le NK2 dans une conformation fermée et empêche sa dimérisation (Tolbert et al., 2010). Le NK2 inhibe ainsi l'action mitotique ou angiogénique de Met (Chan et al., 1993; Montesano et al., 1998).

De même, une molécule NK4 a été générée, correspondant à la chaîne α de l'HGF/SF dénuée de chaîne β (Date et al., 1997). Plus tard, il s'est avéré que ce variant était naturellement généré en situation d'inflammation par clivage protéolytique de l'HGF/SF par les chymases, des enzymes sécrétées par certains leucocytes appelés mastocytes (Raymond et al., 2006). Le NK4 a deux modes d'action indépendants : d'une part il agit comme un puissant antagoniste de Met et, d'autre part, il inhibe l'angiogénèse indépendamment de la signalisation de Met. En effet, le NK4 bloque la liaison des intégrines des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire inhibant donc les signaux pro-angiogénèse qui en découlent (Sakai et al., 2009). Ainsi, NK4 a montré des effets anti-tumoraux, anti-métastatiques et anti-angiogéniques dans plusieurs modèles pré-cliniques (Mizuno and Nakamura, 2013). Sa capacité à inhiber à la fois l'angiogénèse et le récepteur Met, qui peut être impliqué dans les résistances aux anti-angiogéniques, en fait une molécule d'intérêt (Comito et al., 2011; Cooke et al., 2012).

Enfin, des versions mutées de l'HGF/SF ont également été générées. L'une d'entre elles, rendue non clivable par une substitution au niveau du site de clivage (mutation R489Q), n'active ainsi pas Met. *In vivo*, son expression systémique par injection de vecteurs lentiviraux ou de la protéine purifiée diminue le développement et la vascularisation de tumeurs et de métastases (Mazzone et al., 2004). D'autres mutations induisent des modifications de conformation qui ne modifient pas l'affinité de l'HGF/SF pour Met mais le

changent en antagoniste du récepteur Met. En effet, lors de la liaison de l'HGF/SF à Met, le domaine N interagit avec la chaîne β et stabilise l'HGF/SF dans une conformation permettant d'induire l'activation de Met. Des substitutions sur au niveau de ce domaine d'interaction (V495A ou D672N) diminue de plus de 90% la capacité de l'HGF/SF à activer le récepteur Met (Kirchhofer et al., 2007).

b. Les leurres au ligand

Des molécules correspondant à la partie extracellulaire de Met et jouant le rôle de leurres ont également été développées. Ainsi, le domaine Sema ou une version de la partie extracellulaire de Met nommée « decoyMet » ont été développées et inhibent les réponses biologiques induites par Met en réponse au ligand ou dans le cadre d'une activation indépendante du ligand. Ces molécules peuvent à la fois lier l'HGF/SF, prévenant son interaction avec le récepteur Met et jouant le rôle de leurre au ligand, et former des hétérodimères non fonctionnels avec Met, déstabilisant ainsi les homodimères actifs et les réponses qu'ils contrôlent (Kong-Beltran et al., 2004; Michieli et al., 2004). De même, la molécule chimérique Met-Fc, constituée de la partie extracellulaire de Met et de la région Fc des anticorps, joue également le rôle de leurre au ligand et inhibe la croissance de tumeurs dans des expériences de xénogreffes de lignées dépendantes de la présence d'HGF/SF (Coxon et al., 2009).

4) L'émergence de résistances aux thérapies ciblant Met

L'efficacité des thérapies ciblées actuelles est souvent limitée par l'émergence de cellules cancéreuses résistantes grâce à certaines altérations géniques. L'agent thérapeutique utilisé exerce alors une pression de sélection favorisant le développement des cellules résistantes. Ainsi, il est probable que, dans les prochaines années, des mécanismes de résistance aux thérapies ciblant Met soient découverts chez les patients, de tels phénomènes ayant déjà été observés dans des études précliniques.

La résistance peut exister préalablement au traitement. Elle est alors dite innée. Il a par exemple été montré que certaines mutations du domaine kinase de Met retrouvées dans les tumeurs rénales, comme les mutations L1213V et Y1248H, modifient sa conformation et empêchent l'accès à l'inhibiteur de l'activité kinase SU11274, le rendant inefficace (Berthou et al., 2004). Ces mêmes mutations sont par contre efficacement inhibées par d'autres composés, comme l'AM7 (Bellon et al., 2008). Ces données indiquent que la présence de

mutations au sein de la séquence de Met pourrait être un marqueur de sélection de l'approche thérapeutique.

Le plus souvent, les résistances apparaissent au cours du traitement. Elles sont alors dites acquises. Ainsi plusieurs mécanismes de résistance acquise ont déjà été décryptés, qui permettent de maintenir activées les voies de signalisation en aval de Met. *In vitro*, ces résistances sont générées en traitant des lignées cancéreuses pulmonaires ou gastriques pendant plusieurs semaines avec des doses croissantes d'un inhibiteur de Met, comme le PHA-665752 ou le crizotinib, puis en sélectionnant les clones survivants pour les étudier. Ces expériences ont montré que la résistance aux inhibiteurs de Met peut être induite par une activation des membres de la famille HER comme l'EGFR, en miroir à l'acquisition de résistances aux anti-EGFR par le récepteur Met. Ainsi, ces récepteurs semblent capable de compenser la perte d'activité l'un de l'autre, entretenant de véritables liaisons dangereuses (Corso et al., 2010; McDermott et al., 2010). La résistance aux inhibiteurs de Met peut aussi être induite l'amplification génique de Met suivie d'une amplification génique de K-RAS. Dans ce cas, les lignées passent d'une addiction à Met à une addiction à K-RAS (Cepero et al., 2010; Qi et al., 2011). Enfin, la survenue de mutations activatrices au sein de la séquence de Met peut également entraîner une résistance des cellules au PHA ou au crizotinib. L'apparition de ces mutations activatrices a aussi été démontrée dans un modèle de xénogreffe de cellules tumorales en souris traitées au crizotinib. Dans des lignées établies à partir des tumeurs résistantes, les mutations Y1230H et Y1230C ont ainsi été observées. Elles pourraient limiter la capacité des ITKs utilisés à se lier au récepteur Met ou favoriser l'adoption d'une conformation constitutivement active par le domaine kinase. (Qi et al., 2011).

5) Perspectives

A l'heure actuelle, l'implication du couple HGF/SF-Met dans le cancer ne fait plus de doute. La dérégulation de sa signalisation dans de nombreux cancers en fait une cible thérapeutique de choix pour les compagnies pharmaceutiques. Cependant, les résultats des premiers essais cliniques ciblant ces oncogènes sont mitigés. Malgré l'approbation de composés multi-cibles, dans certains cas bien précis, d'autres agents ayant montré un grand potentiel lors d'études précliniques ont été un échec lors d'essais clinique. C'est le cas du tivantinib ou de l'onartuzumab, dont les essais ont été stoppés prématurément à cause d'un manque d'efficacité. Plusieurs éléments peuvent expliquer ces résultats et fournir des indices sur la direction à prendre pour les futures recherches.

a. Cibler des cancers moins avancés

Les patients recrutés dans les essais ayant récemment échoué étaient en seconde ou troisième ligne de traitement. Les traitements précédents ont ainsi pu favoriser chez ces patients l'émergence de clones particulièrement résistants et agressifs. De nouveaux essais de phase III sont actuellement en cours, proposant le tivantinib en seconde ligne chez des patients atteints de carcinomes hépatocellulaires et l'onartuzumab en combinaison avec l'erlotinib en première ligne de traitement chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (www.clinicaltrials.gov).

b. Identifier de nouveaux marqueurs de réponse aux traitements

Il est également possible que les biomarqueurs à utiliser pour sélectionner les patients soient à reconsidérer. En effet, le seul critère pris en compte à l'heure actuelle est la surexpression du récepteur Met, détectée par IHC. Cependant, la surexpression de Met dans des tumeurs ne signifie pas forcément que celui-ci est activé. Par exemple une étude montre que Met est phosphorylé dans 5,6% des échantillons d'une cohorte de cancers du poumon non à petites cellules alors que 22,2% des tumeurs surexpriment Met (Tsuta et al., 2012). De même, dans une cohorte de cancers gastriques, Met est phosphorylé dans seulement 6,6% des échantillons alors que 63% surexpriment Met (Janjigian et al., 2011). De manière intéressante, des lignées tumorales de cancer de poumon dans lesquelles Met est constitutivement phosphorylé sont particulièrement sensibles à des inhibiteurs de Met comme le PHA665752 (Matsubara et al., 2010). La détection des formes phosphorylées du récepteur Met pourrait donc permettre d'identifier un sous-groupe de patients plus susceptible de répondre aux thérapies ciblant Met, bien qu'une méthodologie rigoureuse reste à établir concernant les anticorps à utiliser et le meilleur moyen de manipuler les biopsies ou pièces opératoires sans perdre la phosphorylation de Met, qui est une modification post-traductionnelle fragile.

Un autre marqueur prometteur est l'amplification génique de *met*. En effet, des études précliniques montrent que les inhibiteurs de Met sont particulièrement efficaces dans des lignées cellulaires présentant ce type d'altération (Smolen et al., 2006; Lee et al., 2011; Tanizaki et al., 2011; Okamoto et al., 2012). Ces résultats sont en accord avec des observations réalisées lors de tests cliniques : dans un essai de phase I, le crizotinib a induit une réponse objective dans à peu près deux tiers des patients présentant une amplification génique de *met*, bien que ces patients ne représentent qu'une faible proportion de la cohorte (0,8%) (Camidge et al., 2014). De même, un essai de phase I destiné à évaluer l'inhibiteur AMG337 montre une réponse efficace dans les patients présentant une amplification

génique de *met* (8/45, soit 15.5%) (Hong et al., 2014). De manière intéressante, la proportion de patients avec amplification de *met* est très variable suivant les études. Par exemple dans des cohortes de cancer gastrique, elle peut aller de 0% à 30%, même si une majorité d'équipes l'estiment entre 4% et 10%. Ces différences peuvent en partie être expliquées par le fait que les techniques utilisées (FISH ou PCR) et les seuils fixés pour définir l'amplification varient selon les études (Kawakami et al., 2014). La meilleure méthodologie à utiliser pour définir l'amplification de *met* reste donc à définir.

La surexpression d'HGF/SF dans les tumeurs pourrait aussi être un biomarqueur intéressant, notamment en ce qui concerne les thérapies visant à bloquer l'interaction entre Met et son ligand mais elle n'a pas été prise en compte jusqu'à maintenant.

Enfin, la présence de mutations dans la séquence de Met pourrait également être un critère sur lequel sélectionner les patients. En effet, l'étude de l'effet de l'inhibiteur multicycles foretinib chez des patients atteints de cancers papillaires rénaux montre que le taux de réponse global est plus élevé chez les patients présentant une mutation germinale dans le domaine kinase de Met que chez les autres (50% contre 17,5%) Ce résultat est probablement dû à l'importance de ces mutations pour la transformation cellulaire dans ce type de cancer (Choueiri et al., 2013). L'effet des ITKs semble par contre spécifique des mutations touchant directement le domaine et l'activité kinase du récepteur Met. En effet, le crizotinib n'a pas d'effet particulier sur des lignées cellulaires cancéreuses pulmonaires présentant une mutation dans le domaine juxtamembranaire ou dans le domaine extracellulaire de Met (Tanizaki et al., 2011). La seule exception pourrait être le cas des délétions de l'exon 14, qui entraînent l'accumulation d'une version raccourcie de Met anormalement stable et une réponse amplifiée des cellules à l'HGF/SF (Kong-Beltran et al., 2006) et qui a été détectée dans 4,3% d'une cohorte de cancers pulmonaires, ce qui plus fréquent que ce qui était supposé jusqu'à présent (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). En effet, l'utilisation d'ITKs inhibent les propriétés tumorales de cellules arborant cette version raccourcie de Met (Kong-Beltran et al., 2006). Il serait aussi intéressant d'évaluer l'impact d'agents capables de contrebalancer la stabilité accrue de cette version de Met en induisant sa dégradation, comme l'anticorps monoclonal DN30.

c. Identifier des mécanismes de résistance innée.

Si certains mécanismes de résistance acquise aux thérapies ciblant Met commencent à être compris, les effets mitigés de composés comme le tivantinib ou l'onartuzumab chez des patients n'ayant jamais été traités avec des inhibiteurs de Met suggère l'existence possible de résistances innées. De manière intéressante, il a récemment été montré que l'inhibition

du récepteur Met induit une augmentation immédiate de HSP27 (Heat Shock Protein 27), une protéine anti-apoptotique, au sein de lignées addictes à Met. Comme HSP27 est également connue pour induire une résistance aux anti-EGFR ainsi qu'aux chimiothérapies, les auteurs suggèrent qu'elle puisse être impliquée dans le succès mitigé des thérapies ciblant Met. Cependant, aucune observation clinique ne permet de le confirmer (Musiani et al., 2014).

De même, il a été montré que, dans des lignées addictes à Met, des inhibiteurs de Met n'inhibent sa signalisation que transitoirement. En effet, les voies de signalisation en aval de Met (MAPKinase, PI3Kinase et STAT3) se réactivent indépendamment de Met au bout de 48h à 96h. Au contraire, l'utilisation d'inhibiteurs de HSP90 inhibe Met et ses voies de signalisation de manière durable. Ces résultats suggèrent que, au moins dans les lignées cancéreuses avec amplification de *met*, le récepteur Met fait partie d'un réseau de signalisation capable de compenser rapidement son inhibition et de maintenir actifs les signaux de survie transmis aux cellules (Wang et al., 2009; Lai et al., 2014a). Dans ce cas aussi, des études *in vivo* ou cliniques restent à effectuer pour confirmer ces résultats.

L'existence de mécanismes permettant de compenser rapidement l'inactivation de Met au sein des cellules cancéreuses pourrait donc expliquer l'effet modeste des thérapies ciblées actuelles. L'identification de ces mécanismes et la mise au point d'agents capable de les prévenir pourrait constituer une piste à suivre pour améliorer la réponse des patients aux thérapies anti-Met.

d. Optimiser les protocoles

Le protocole selon lequel administrer les traitements peut également avoir une importance. Une étude récente a montré que des lignées addictes à Met devenues résistantes à l'anticorps DN30 étaient toujours sensibles à des ITKs et inversement. De plus, dans cette étude, les cellules résistantes au DN30 deviennent également addictes à cet agent thérapeutique. En effet, elles acquièrent leur résistance en surexprimant Met et l'arrêt brutal du traitement au DN30 induit une signalisation de Met tellement intense qu'elle déclenche l'apoptose (Martin et al., 2014). De manière intéressante, le même type d'observation a déjà été réalisé pour l'oncogène BRAF. En effet, il a été montré que des xénogreffes de cellules addictes à BRAF et devenues résistantes aux inhibiteurs de BRAF régressent lors de l'arrêt du traitement, vraisemblablement à cause d'une signalisation de BRAF trop intense. Dans ce même modèle, un traitement discontinu évite par contre le développement de résistances aux anti-BRAF (Das Thakur et al., 2013). Ainsi, l'utilisation combinée ou en alternance d'anticorps et d'ITKs chez un même patient pourrait optimiser

l'efficacité des thérapies ciblant le récepteur Met et l'administration discontinuée de ces agents permettrait peut-être de limiter le développement de résistances (Martin et al., 2014).

e. Augmenter le nombre de cibles

Il est maintenant clairement établi que les résistances aux thérapies ciblées proviennent de l'activation de protéines capables de restaurer les signaux de survie inhibés par ces thérapies. Ainsi, l'activation du récepteur Met peut induire la résistance aux anti-EGFR ou aux anti-ErbB2. De même, ces protéines peuvent induire la résistance aux inhibiteurs de Met. Les thérapies ciblées étant relativement bien tolérées, l'idée d'inhiber plusieurs cibles en même temps peut paraître attrayante. Le récent succès des inhibiteurs multi-cibles semble confirmer cette hypothèse.

Ainsi, il a récemment été montré que le récepteur Met pouvait être impliqué dans la résistance de cancers gastriques ou mammaires aux thérapies ciblant ErbB2. De plus, dans des cellules issues de cancers gastriques surexprimant Met et ErbB2, le traitement par des inhibiteurs de Met et d'ErbB2 inhibe plus efficacement les voies de signalisation comme PI3K/Akt. Ces résultats apportent des preuves de l'intérêt à tester l'association d'un inhibiteur de Met aux anti-ErbB2 actuels dans les cancers ErbB2⁺ dont la résistance est due à Met (Minuti et al., 2012; Ha et al., 2014; Zhang et al., 2014b).

L'efficacité de l'inhibition simultanée de l'EGFR, de Met et du VEGFR2 a été démontrée dans des lignées cellulaires issues de cancer du poumon présentant une mutation de l'EGFR. Bien que la combinaison d'inhibiteurs de l'EGFR et de Met (onartuzumab) chez des patients atteints de cancers du poumon ait récemment échoué lors d'un essai clinique, l'inhibition combinée de ces trois cibles n'a pas encore été testée dans le cadre d'essai clinique.

IV. Modification de l'activité de Met par clivages protéolytiques

La phosphorylation de Met lui permet d'induire de nombreuses réponses biologiques par le biais d'un réseau complexe de transducteurs du signal et d'effecteurs. Il s'agit du mode de signalisation du récepteur le plus étudié. Mon équipe a cependant démontré que le récepteur Met est la cible de nombreux clivages protéolytiques. Ces clivages sont indépendants du ligand et constituent un mécanisme original de régulation de la signalisation de Met. En effet,

ils peuvent être soit impliqués dans le contrôle de l'expression de Met, soit changer les fonctions pro-survie du récepteur en fonctions d'amplification de la mort cellulaire.

A) PS-RIP

Comme évoqué précédemment, la dégradation de Met peut être induite par le ligand, qui provoque l'internalisation de Met et sa dégradation par la machinerie lysosomale. Cette dégradation permet de contrôler la signalisation de Met en diminuant la quantité de récepteur activé.

Un autre mécanisme de dégradation de Met, le PS-RIP (PreSenilin-dependent Regulated Intramembrane Proteolysis), opère indépendamment de l'HGF/SF. Ce mécanisme fait intervenir deux clivages successifs. Le premier clivage est réalisé par des métalloprotéases membranaires. Il a lieu du côté extracellulaire du récepteur, à proximité de la membrane plasmique. Ce clivage, généralement appelé élagage (ou « shedding »), sépare la partie extracellulaire de Met capable de lier le ligand (fragment N-terminal, ou NTF pour « N-Terminal Fragment »), du domaine kinase du récepteur (fragment C-terminal, ou CTF pour C-terminal Fragment). Alors que le NTF est relargué dans le milieu environnant, le CTF est intracellulaire et ancré à la membrane. Le récepteur Met élagué est ainsi inactivé (Prat et al., 1991; Foveau et al., 2009). L'utilisation de siRNAs a permis d'identifier ADAM10 comme la principale métalloprotéase impliquée cette première étape d'élagage (Schelter et al., 2010).

Le fragment intracellulaire subit un second clivage par le complexe γ -sécrétase, dont la sous-unité catalytique est la preseniline. Ce clivage a lieu du côté intracellulaire, au niveau du domaine juxtamembranaire. Le fragment généré, Met-ICD (IntraCellular Domain), est cytoplasmique et est dégradé par le protéasome (Foveau et al., 2009).

Le PS-RIP de certains récepteurs membranaires génère des fragments qui acquièrent une nouvelle fonction au sein de la cellule. Par exemple le PS-RIP du récepteur Notch génère un fragment nommé NICD (Notch IntraCellular Domain) qui transloque dans le noyau et y régule l'expression de nombreux gènes et qui, en fonction du contexte cellulaire, induit la prolifération, l'apoptose ou encore la différenciation (Hori et al., 2013). Le PS-RIP de ErbB4 libère le fragment ErbB4-ICD qui colocalise avec les mitochondries et favorise leur perméabilisation, amplifiant l'apoptose de cellules cancéreuses (Naresh et al., 2006). Les fragments CTF et ICD de Met, au contraire, sont très rapidement dégradés et ne sont observables que s'ils sont stabilisés par des inhibiteurs de la γ -sécrétase et du protéasome (Foveau et al., 2009).

Le PS-RIP peut avoir lieu au niveau de la membrane plasmique et relarguer le fragment Met-NTF dans l'environnement extracellulaire tandis que le fragment CTF est pris en charge par la voie du protéasome. Cependant, notre équipe a montré que le PS-RIP peut aussi avoir lieu après internalisation de Met dans des endosomes. Dans ce cas, les fragments Met-NTF et Met-CTF générés sont tous les deux acheminés et dégradés par les lysosomes, restant à l'intérieur de la cellule. Le Met-NTF a la capacité de lier le domaine K1 de l'HGF/SF, suggérant un rôle de leurre au ligand. Ainsi, lorsque le PS-RIP a lieu à la membrane, il permet la production d'un fragment Met-NTF capable de réguler négativement la signalisation de Met tandis que l'internalisation de Met avant son clivage permet de séquestrer ce fragment, qui constitue alors un simple intermédiaire de dégradation. De manière intéressante, l'un ou l'autre de ces modes de dégradation de Met prédomine selon le type cellulaire étudié (Ancot et al., 2012).

Le récepteur Met étant impliqué dans de nombreux cancers, plusieurs équipes ont cherché à savoir si le fragment Met-NTF est détectable dans le sérum de patients et s'il pouvait avoir un rôle pronostic. Des études précliniques sur des modèles de xénogreffe en souris ont montré que la production du Met-NTF corrèle effectivement avec la progression des tumeurs (Athauda et al., 2006). Cependant, les résultats obtenus sur des cohortes de patients sont contradictoires. En effet, la quantité de Met-NTF dans le sérum de patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules avancés est proportionnel à l'expression de Met par la tumeur ainsi qu'à sa taille. Dans cette étude, le fragment constitue un marqueur de mauvais pronostic (Fu et al., 2013). Chez des patients atteints de myélomes multiples, le taux de Met-NTF détecté dans le sérum n'est par contre pas sensiblement différent de celui d'individus sains. Une légère baisse de ce taux serait même associée à un stade plus avancé (Wader et al., 2011). Enfin, une étude montre que le taux de Met-NTF est plus faible chez des patients atteints de cancers gastrique que chez des individus sains (Yang et al., 2013). Ainsi, si l'une de ces études cliniques identifie le fragment Met-NTF comme un marqueur de la progression tumorale, les deux autres suggèrent qu'un fort taux de Met-NTF pourrait exercer un contrôle négatif sur certains cancers. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre si ces résultats sont reproductibles et si les différences observées sont liées au type de cancer étudié.

Si l'HGF/SF n'a pas d'influence sur la dégradation de Met par PS-RIP, d'autres molécules peuvent l'amplifier, comme les esters de phorbol, la suramine (un inhibiteur non spécifique des RTKs), l'EGF ou le LPA (LysoPhosphatidic Acid). Le clivage de Met induit par ces deux derniers composés nécessitent l'activation de l'EGFR et de la voie des MAPKineses (Galvani et al., 1995; Nath et al., 2001; Xu and Yu, 2007). L'anticorps monoclonal DN30, un agent thérapeutique potentiel ciblant le récepteur Met, induit la dégradation de Met par PS-RIP,

permettant à la fois de diminuer son expression et de libérer dans le milieu environnant du Met-NTF pouvant agir comme un leurre au ligand (Ancot et al., 2012).

B) Les caspases

Le récepteur Met joue un rôle important dans le contrôle de la balance survie-apoptose. Alors que son activation par l'HGF/SF induit des réponses de survie dans un grand nombre de cellules, son clivage protéolytique par les caspases libère son potentiel pro-apoptotique.

1) L'apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée connu depuis les années 1970 (Kerr et al., 1972). Il s'agit d'un mécanisme actif important pour le bon fonctionnement de l'organisme car impliqué dans des processus comme le développement embryonnaire, le turn-over des cellules somatiques et l'élimination des cellules immunitaires dont l'action est dirigée contre l'organisme. L'apoptose présente des caractéristiques précises. Ainsi, le noyau et le nucléole sont très vite fragmentés. A l'inverse, l'intégrité des organelles et de la membrane plasmique est maintenue, permettant d'éviter la libération du contenu cytoplasmique dans l'environnement et d'induire l'inflammation. La membrane plasmique bourgeonne jusqu'à ce que des portions de cellule se détachent pour générer des corps apoptotiques contenant du matériel cytoplasmique et nucléaire. Les corps apoptotiques sont ensuite phagocytés, empêchant l'inflammation (Elmore, 2007).

Deux principaux mécanismes permettent d'activer l'apoptose : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. Ces deux voies ont été étudiées de manière intensive pendant plusieurs décennies et vont être brièvement présentées. La voie extrinsèque est initiée par des récepteurs membranaires de la superfamille du TNF comme le TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1), Fas ou encore TRAIL Receptor (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor). L'activation de ces récepteurs entraîne le recrutement de protéines adaptatrices comme TRADD (Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain protein) ou FADD (Fas-Associated protein with Death Domain), qui permettent l'activation de protéines effectrices, les caspases. La voie intrinsèque est principalement régulée par les mitochondries, qui intègrent un grand nombre de stress (dommages à l'ADN, espèces réactives à l'oxygène...) et de signaux anti-apoptotiques. Quand la balance penche en faveur de la mort cellulaire, les mitochondries se perméabilisent et libèrent dans le

cytoplasme des facteurs pro-apoptotiques, tels que le cytochrome c ou SMAC/Diablo, favorisant l'activation des caspases. Cette perméabilisation membranaire peut résulter de deux mécanismes. En effet, des protéines pro-apoptotiques comme Bak ou Bax peuvent s'insérer dans la membrane externe des mitochondries pour y générer des pores par lesquelles les facteurs pro-apoptotiques sont libérés de l'espace intermembranaire mitochondrial. Un autre mécanisme consiste en l'ouverture d'un canal situé dans la membrane interne des mitochondries, le PTP (Permeability Transition Pore), en réponse à certains inducteurs tels qu'une augmentation de la concentration en calcium ou la génération de ROS. L'ouverture de ce canal déclenche, entre autre, le gonflement de la matrice mitochondriale par entrée d'eau, le dépliement de la membrane interne et la rupture de la membrane externe. Le contenu cytotoxique de l'espace membranaire est ainsi libéré dans le cytoplasme (Galluzzi et al., 2012; Morciano et al.). La perméabilisation des mitochondries aboutit la plupart du temps à l'activation des caspases mais, dans certains cas, l'ouverture du PTP s'accompagne d'une mort indépendante des caspases de type nécrose.

Les caspases (CysteinyI ASPartate proteASE) forment une famille de protéases à cystéine et à acide aspartiques. Elles sont les principales effectrices de l'apoptose et clivent de très nombreux substrats après un acide aspartique (D) précédé d'un site consensus peu strict de 3 acides aminés. Ces 3 acides aminés précèdent déterminent la spécificité du substrat pour certaines caspases (Thornberry et al., 1997). Il existe deux grands groupes de caspases : les caspases initiatrices (caspases 2, 8, 9 et 10) et les caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7). Les caspases initiatrices sont activées en premier par leur recrutement par les récepteurs de mort ou suite à la perméabilisation mitochondriale. Elles clivent ensuite les caspases effectrices de manière à les activer (Elmore, 2007; Galluzzi et al., 2012). Ces dernières sont responsables du clivage de nombreux substrats, cytoplasmiques comme nucléaires : des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire comme des kinases, des protéines structurales comme la laminine ou certains composants du cytosquelette, des protéines impliquées dans les processus de transcription et de traduction, des protéines impliquées dans le métabolisme ou la réparation du génome ou encore des protéases comme les endonucléases (Lüthi and Martin, 2007).

Certains de ces clivages sont inactivateurs des substrats. Ainsi, le clivage des lamines A/C et B1, qui assurent l'intégrité du noyau, participe à la déstructuration de cet organe (Ruchaud et al., 2002). De même, le clivage de la kératine 18, un constituant des filaments intermédiaires, est impliqué dans la désorganisation du cytosquelette et le clivage de la protéine Akt inhibe ses fonctions de survie (Caulín et al., 1997; Schutte et al., 2004). Dans d'autres cas, les clivages réalisés par les caspases permettent un gain de fonction. Ainsi, le clivage de la sérine-thréonine kinase Mst-1 par les caspases induit sa relocalisation dans le

noyau, où elle induit la condensation de la chromatine, un phénomène caractéristique de l'apoptose, *via* la phosphorylation de la protéine histone H2B (Anand et al., 2008). De même, le clivage de la kinase ROCK-1 par la caspase 3 permet de phosphoryler les chaînes légères de la myosine, provoquant ainsi le phénotype typique de bourgeonnement membranaire des cellules apoptotiques (Sebbagh et al., 2001). Enfin, dans certains cas, le clivage des caspases permet de réorienter la fonction des protéines. C'est notamment le cas pour certains récepteur membranaires qui induisent des réponses de survie, de prolifération ou de migration en présence de leur ligand mais qui, en absence de ligand et suite à leur clivage par les caspases, acquièrent des propriétés pro-apoptotiques. Ces protéines appartiennent à la famille des récepteurs à dépendance.

2) Clivages caspases et récepteurs à dépendance

La notion de récepteur à dépendance apparaît dans les années 90, avec l'étude du récepteur à neurotrophines $p75^{NTR}$ et du récepteur de la nétrine 1, DCC (Deleted in Colorectal Cancer). $p75^{NTR}$ est un récepteur membranaire ayant pour ligand les neurotrophines : il lie le NGF (Nerve Growth Factor) avec une haute affinité et le BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), NT3 et NT4 avec une faible affinité. Il est capable de s'associer avec les récepteurs de la famille Trk et de moduler leur affinité pour certaines neurotrophines (Goldschneider and Mehlen, 2010). Le $p75^{NTR}$ présente une homologie de structure avec les récepteurs de mort de la famille des TNF, ce qui a conduit à supposer qu'il puisse induire un signal de mort en absence de NGF. En effet, l'expression de $p75^{NTR}$ dans des cellules nerveuses induit l'apoptose des cellules, qui peut être inhibée par l'ajout de NGF (Rabizadeh et al., 1993). Chez la souris l'extinction du gène $p75^{NTR}$ entraîne une augmentation de la quantité de neurone cholinergiques et une hyperinnervation de l'hippocampe (Yeo et al., 1997; Naumann et al., 2002). De plus, il a été montré que des souris hémizygotés pour le gène *ngf* présentent une réduction du nombre de neurones cholinergiques. Leur croisement avec des souris $p75^{NTR} -/-$ entraîne une restauration partielle du nombre de cellules nerveuses chez les descendants, suggérant que l'expression de $p75^{NTR}$ par les cellules les rend dépendantes de la présence de NGF (Naumann et al., 2002).

Un rôle de récepteur à dépendance a également été attribué au récepteur DCC. En présence de son ligand, la nétrine 1, DCC stimule la croissance axonale des cellules nerveuses et la survie de cellules somatiques comme les entérocytes. Pourtant, l'expression de DCC est fréquemment perdue dans certains cancers comme les cancers colorectaux, les cancers gastriques ou les cancers de la prostate (Fearon et al., 1990; Mehlen and Fearon,

2004) et cette perte de DCC est associée à un mauvais pronostic (Shibata et al., 1996; Sun et al., 1999). Ces observations suggèrent un rôle de suppresseur de tumeur assez contradictoire avec ses fonctions de survie. Il est alors supposé que DCC est capable d'induire l'apoptose en absence de son ligand. En effet, la réexpression de DCC dans des lignées cancéreuses limite leur potentiel tumorigène *in vitro* et *in vivo* (Klingelutz et al., 1993; Velcich et al., 1999). De même, son expression dans des lignées dans lesquelles il n'est pas présent de manière endogène induit l'apoptose et l'ajout de nétrine 1 permet de prévenir l'apoptose (Mehlen et al., 1998; Chen et al., 1999).

A l'heure actuelle, une quinzaine de récepteurs à dépendance ont été identifiés. Ces récepteurs ne présentent aucune homologie de séquence et appartiennent à diverses familles : le récepteurs aux neurotrophines p75^{NTR}, des récepteurs à la nétrine comme DCC ou UNC5H2, des récepteurs au morphogène Sonic Hedgehog comme Patched 1 ou CDON, certaines intégrines, la plexine-D1, le récepteur aux androgènes ou encore des récepteurs tyrosine kinase comme TrkC ou Met. Leur action pro-apoptotique nécessite, dans un premier temps, leur clivage par les caspases au niveau d'un ou de deux sites consensus. Ce clivage sépare un fragment toujours ancré dans la membrane plasmique et un fragment intracellulaire. L'action pro-apoptotique des récepteurs à dépendance, dépend d'un domaine pro-apoptotique nommé ADD (Addiction Dependence Domain). Les domaines ADDs ne partagent aucune homologie de séquence et se définissent uniquement par leur fonction pro-apoptotique. Ils sont généralement contenus dans le fragment transmembranaire du récepteur mais dans certains cas, ils sont portés par le fragment intracellulaire. Les seuls récepteurs pour lesquels ce mécanisme n'a pas été clairement été démontré à l'heure actuelle sont les intégrines et p75^{NTR} (Delcros and Mehlen, 2013). Les mécanismes faisant suite au clivage des caspases sont par contre très divers. Le fragment transmembranaire de certains récepteurs, comme DCC ou Ptch1, recrutent et activent la caspase 9 (Mehlen et al., 1998; Forcet et al., 2001; Mille et al., 2009). D'autres fragments, comme UNC5H2/B ou UNC5H1/A mènent à l'activation de protéines kinase pro-apoptotiques comme DAPK ou c-Jun (Llambi et al., 2005; Guenebeaud et al., 2010). Le fragment intracellulaire d'UNC5D transloque dans le noyau et induit la transcription de gènes pro-apoptotiques (Zhu et al., 2013) tandis que le fragment intracellulaire de TrkC et de la plexine D1 induisent la perméabilisation mitochondriale et le relargage de cytochrome c dans le cytoplasme (Ichim et al., 2013; Luchino et al., 2013).

Le fait que ces récepteurs soient à la fois des activateurs d'apoptose et des substrats des caspases peut paraître paradoxal : en effet, comment les récepteurs à dépendance peuvent-ils induire l'activation des caspases s'ils ont besoin d'être clivés par elles pour devenir pro-apoptotiques ? Il est possible qu'un clivage par d'autres protéases permette d'initier une

boucle d'amplification par les caspases. Une autre possibilité est qu'il y ait, même dans les cellules non apoptotiques, une faible activité caspase basale et que celle-ci soit suffisante pour initier le clivage d'un récepteur non lié à son ligand (Delcros and Mehlen, 2013). Dans le cas de DCC, il a été montré que celui-ci interagit avec la caspase 3 en présence de la nétrine 1. Il est donc possible qu'en présence de son ligand, DCC adopte une conformation qui empêche son clivage par les caspases tandis qu'en absence de ligand, le démasquage du domaine ADD permette l'activation et l'amplification de la caspase 3 et de la caspase 9 (Forcet et al., 2001).

Les récepteurs à dépendance constituent donc une famille de protéines dont l'activité est modifiée par un clivage caspases, passant de pro-survie à pro-apoptotique. Mon équipe a démontré que le récepteur Met appartient à cette famille et travaille à déchiffrer les mécanismes permettant au récepteur et d'amplifier l'apoptose suite à son clivage par les caspases.

3) La conversion pro-apoptotique de Met

Durant l'apoptose, le récepteur Met a en effet un rôle différent de ses signaux pro-survie en présence de ligand. Il est séquentiellement clivé par les caspases au niveau de deux sites : l'acide aspartique D1374 dans la queue C-terminale du récepteur puis l'acide aspartique D1000 dans le domaine juxtamembranaire (Tulasne et al., 2004; Foveau et al., 2006).

Le clivage sur l'acide D1000 sépare le domaine de liaison au ligand du domaine kinase. Le domaine de liaison au ligand, le fragment N-terminal, est ancré à la membrane. Nous avons baptisé ce fragment p100 Met. Le fragment C-terminal comprenant le domaine kinase est libéré dans le cytoplasme. Ce fragment a été baptisé p40 Met caspase. En séparant le site de liaison au ligand du domaine kinase, ce clivage permet de prévenir les réponses de survie normalement induites par l'HGF/SF. D'ailleurs, l'activation de Met et son clivage par les caspases sont deux mécanismes qui s'excluent l'un l'autre puisque la phosphorylation de la tyrosine Y1001 induite par l'HGF/SF empêche la reconnaissance de l'acide aspartique D1000 par les caspases et inhibent le clivage juxtamembranaire de Met (Deheuninck et al., 2009).

Le rôle de ce clivage par les caspases ne se limite cependant pas à l'inactivation de Met. En effet, le p100 Met est encore capable d'interagir avec l'HGF/SF et sa surexpression prévient l'activation de voies de signalisations induites par l'HGF/SF. Le fragment p100 Met

serait donc un leurre au ligand s'accumulant à la membrane plasmique durant l'apoptose et limitant les signaux de survies de l'HGF/SF (Deheuninck et al., 2008).

Le fragment p40 Met caspase s'accumule dans les cellules et présente une activité pro-apoptotique. En effet, son expression ectopique est capable d'amplifier l'apoptose de différents types cellulaires. Cette action est indépendante de l'activité kinase du récepteur. Le clivage caspase sur l'acide D1374, permettant le retrait des quelques acides aminés à l'extrémité C-terminale du récepteur, est important pour l'action pro-apoptotique de p40 Met caspase (Foveau et al., 2006; Ma et al., 2014). Les propriétés pro-apoptotiques de p40 Met reposent au moins en partie sur sa capacité à colocaliser avec les mitochondries et à favoriser leur perméabilisation et donc la libération de cytochrome c dans le cytoplasme. La perméabilisation induite par le p40-Met caspase est dépendante de la protéine pro-apoptotique Bak (Lefebvre et al., 2013).

Chronologiquement, le clivage de Met sur le D1374, libérant l'extrémité C-terminale de Met dans le cytoplasme, est le premier à avoir lieu (Foveau et al., 2006). Il a récemment été montré que ce peptide, nommé DDD (Death Defying Domain), est un inhibiteur des caspases capable d'empêcher l'apoptose. Il permettrait ainsi au récepteur Met d'agir comme un facteur de survie et de retarder la mort cellulaire dans les premiers temps du processus apoptotique. Si le stress cellulaire se maintient, le récepteur Met subit alors le deuxième clivage qui libère le potentiel pro-apoptotique des fragments p100 Met et p40 Met caspases (Ma et al., 2014; Furlan and Tulasne, 2014).

C) Mutations juxtamembranaires et clivages protéolytiques : à la recherche d'un lien

Une majorité des clivages connus du récepteur Met ont lieu au niveau du domaine juxtamembranaire. Des mutations associées aux cancers des VADS, du poumon et aux lymphomes ont également été répertoriées au sein de ce domaine, comme les mutations N945S, R970C, P991S et T992I (Ma et al., 2008). Nous nous sommes donc demandé si les propriétés transformantes de ces mutations étaient dues à leur influence sur les clivages du récepteur Met. Par exemple de telles mutations modifient-elles les clivages déjà connus du récepteur Met ? En créent-elles de nouveaux ?

Pour cela, j'ai testé l'effet de ces mutations sur le devenir du récepteur Met, dans le cadre de transfections stables et transitoires. J'ai ainsi pu démontrer que la mutation R970C, ainsi que d'autres paramètres, ne modifient pas les clivages déjà connus du récepteur Met mais favorisent la survenue d'un clivage original de Met en un fragment de 45kDa. J'ai ensuite

cherché à identifier les protéases impliquées dans ce nouveau clivage. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques m'a permis d'identifier les calpaïnes. Le fragment de 45kDa étant stable dans les cellules, j'ai cherché à déterminer son rôle biologique en générant des clones exprimant stablement p45 Met. Cette première étude m'a permis de mettre en évidence l'existence d'un second clivage original de Met, cette fois-ci lié à un contexte de mort cellulaire indépendante des caspases, en un fragment d'environ 40kDa. En raison de sa ressemblance avec le p40 Met caspase, j'ai cherché à déterminer si ce deuxième fragment possédait le même type de propriétés pro-apoptotiques. Ces nouvelles données sont détaillées dans la partie RESULTATS.

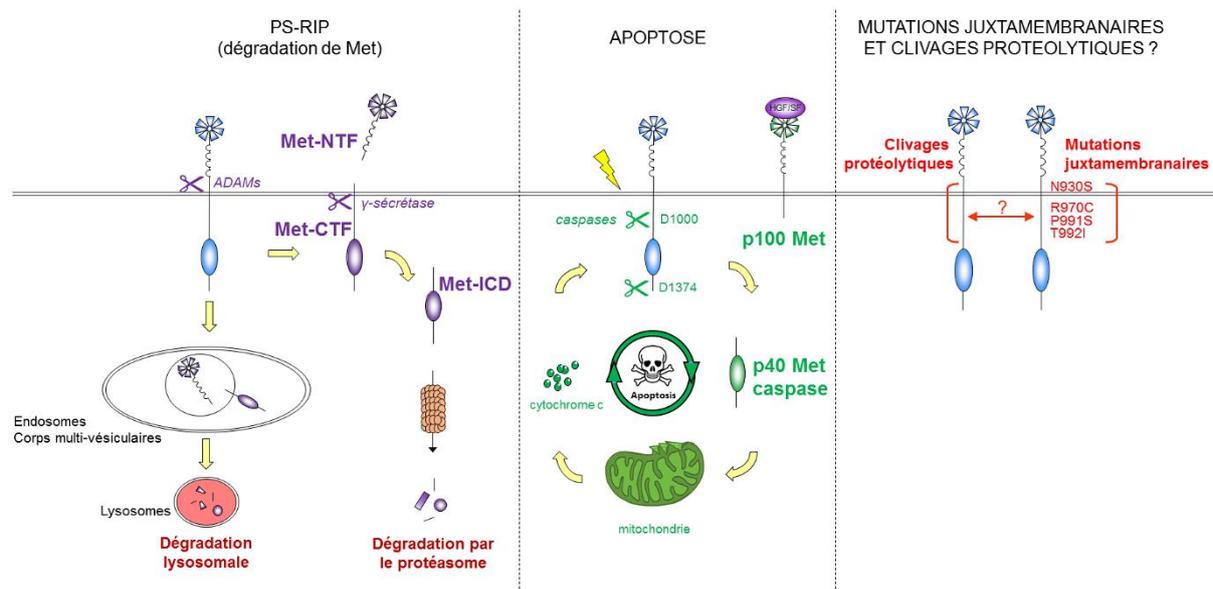


Figure 16 : Clivages protéolytiques et mutations juxtamembranaires du récepteur Met

Gauche – Dégradation de Met par PS-RIP. Milieu – Dégradation de Met par les caspases en un leurre au ligand membranaire (p100 Met) et un fragment intracellulaire amplificateur d'apoptose (p40 Met caspase). Droite – hypothèse d'un lien entre mutations juxtamembranaires et clivages protéolytiques de Met.

V. Calpaïnes, cancer, et mort cellulaire

Certains facteurs, comme la mutation R970C, la densité cellulaire ou un stress calcique favorisent le clivage du récepteur Met par les calpaïnes. Au moins certaines de ces conditions sont associées au cancer, comme la mutation du récepteur Met. Les calpaïnes sont une famille de protéases à cystéines. Depuis une vingtaine d'année, il a été montré qu'elles sont impliquées dans certains phénotypes associés à la transformation cellulaire

comme la migration, l'invasion, l'angiogenèse ou encore le contrôle de la balance survie-mort cellulaire.

A) Des protéases cytoplasmiques dépendantes du calcium

Les calpaïnes sont des protéases à cystéine identifiées pour la première fois en 1964 à partir d'un lysat de cerveau de rat (Guroff, 1964). Il s'agit d'une famille de protéases cytoplasmiques fonctionnant à pH neutre et en présence de calcium. Actuellement, 15 membres sont connus, définis par la présence d'un domaine protéase caractéristique. Les deux calpaïnes les plus étudiées sont la calpaïne 1 (μ -calpaïne) et la calpaïne 2 (m-calpaïne) (Leloup and Wells, 2011). Elles doivent leur nom aux concentrations de calcium nécessaires pour leur activation *in vitro*, respectivement de l'ordre du micro ou du milli-molaire (Mellgren, 1980; Dayton et al., 1981; Inomata et al., 1983). Contrairement aux autres calpaïnes, elles s'activent uniquement par hétérodimérisation avec une sous-unité régulatrice, la calpain-S1 (ou CAPSN1). Alors que certaines calpaïnes, comme les calpaïnes 1 et 2, sont ubiquitaires, d'autres sont spécifiques de certains tissus, comme la calpaïne 3, spécifique des muscles striés squelettiques ou la calpaïne 9, exclusivement détectée dans le tractus digestif (Leloup and Wells, 2011; Storr et al., 2011a).

Les calpaïnes présentent une organisation en 3 ou 4 domaines DI à DIII ou DI à DIV. La calpaïne-S1 est composée de deux domaines, DV et DVI (Figure 17). DI, le domaine le plus N-terminal, semble jouer un rôle auto-inhibiteur. L'activation des calpaïnes peut s'accompagner de son autolyse, qui n'est cependant pas un préalable indispensable (Hosfield et al., 1999). Le domaine DII porte l'activité protéase. C'est le seul domaine à être fortement conservé au sein de toutes les calpaïnes. Il est composé de deux sous-domaines, DIIa et DIIb qui contiennent chacune une partie du site actif. Suite à la liaison de calcium, le domaine DIIb subit une rotation de 50°C et se rapproche du domaine DIIa, permettant la reconstitution d'un domaine catalytique fonctionnel. Le domaine DIII est composé de huit feuillets β antiparallèles, une structure rappelant le domaine C2 impliqué dans l'adressage membranaire de certaines protéines comme les PKC. Ce domaine a de nombreux points de contact avec les domaines DIIa et DIIb et participe vraisemblablement à leur réarrangement en présence de calcium (Hosfield et al., 1999; Strobl et al., 2000). Le domaine DIV et le domaine DVI contiennent 5 motifs EF-hand, parmi lesquels 4 ont pour fonction de lier les ions Ca^{2+} tandis que le dernier est impliqué dans la liaison entre les calpaïnes et la calpaïne-S1 (Imajoh et al., 1987; Blanchard et al., 1997). Enfin, le domaine DV est riche en glycines et favorise l'interaction avec les phospholipides membranaire.

Les calpaïnes sont classées en deux catégories : les calpaïnes classiques, qui possèdent les domaines DI à DIV et les calpaïnes atypiques, qui sont dépourvues du domaine DIV. Alors que la structure des calpaïnes classiques est assez bien conservée, celle des calpaïnes atypiques est plus variable : le domaine DI peut être absent, il peut y avoir des répétitions du domaine DIII et des domaines supplémentaires peuvent être contenus dans la séquence de ces calpaïnes (Sorimachi et al., 2010). De manière intéressante, tous les domaines des calpaïnes peuvent lier au moins un ion calcium et il a été montré que le domaine DII isolé était capable de s'activer en présence de calcium (Tompa et al., 2001; Moldoveanu et al., 2002, 2004). Cela explique que le domaine DIV n'est pas indispensable pour permettre au calcium de contrôler l'activité des calpaïnes atypiques.

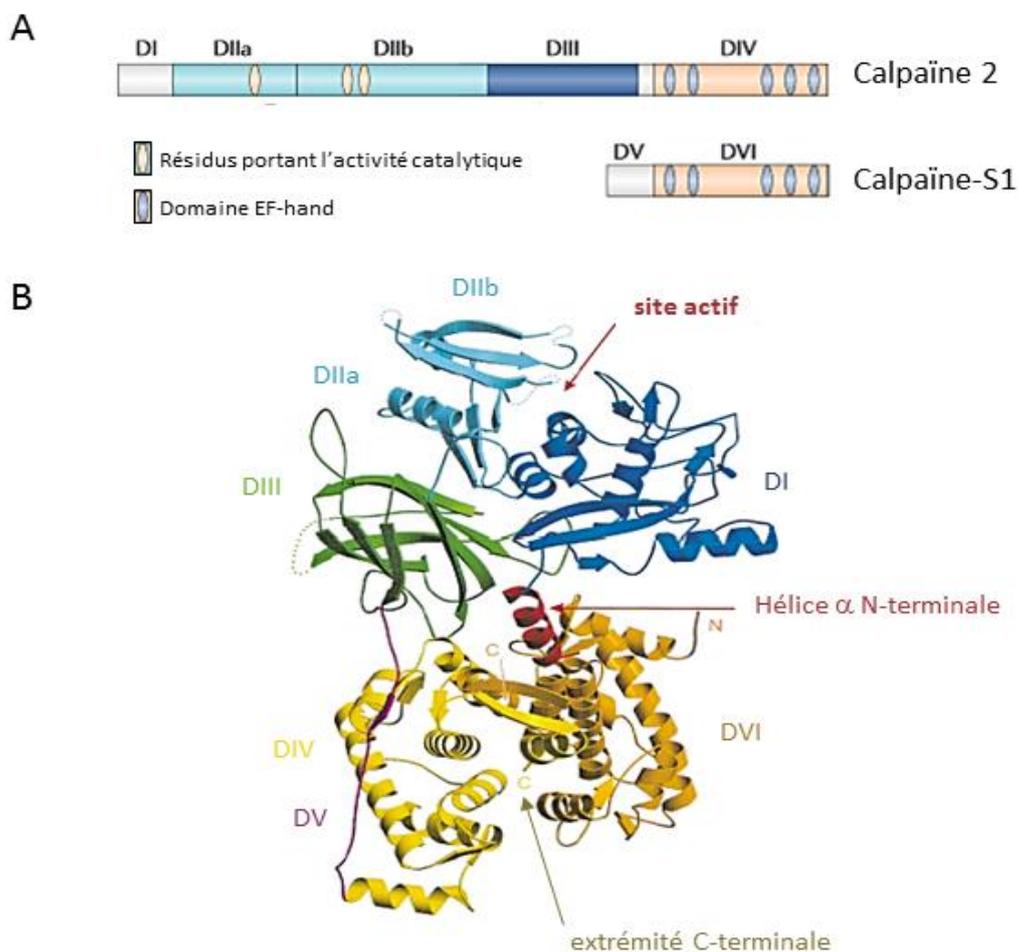


Figure 17 : Domaines et structure tridimensionnelle de la calpaïne 2 dimérisée à la calpaïne-S1.

Schéma tiré de (Storr et al., 2011a) et structure tridimensionnelle tirée de (Hosfield et al., 1999).

Plusieurs processus permettent de moduler l'activation des calpaïnes. Certains mécanismes diminuent la concentration en calcium requise pour l'activation des calpaïnes et favorisent donc leur activation, comme l'autolyse du domaine DI (Suzuki et al., 1981; Imajoh et al., 1986), l'interaction avec des phospholipides comme le PIP₂ (Saïdo et al., 1992) ou la phosphorylation par la PKC α ou ERK (Glading et al., 2001; Xu and Yu, 2007). A l'inverse, La PKA inhibe l'activité de la calpaïne 2 en empêchant son interaction avec le PIP₂ (Shao et al., 2006; Shiraha et al., 2002). Enfin, la calpastatine, un inhibiteur endogène et ubiquitaire des calpaïne, diminue son activité. La calpastatine est stockée sous forme d'agrégats dans le cytoplasme des cellules, à proximité du noyau et libérée suite à l'augmentation de la concentration en calcium (Averna et al., 2003). De nombreuses isoformes sont générées à partir du gène de la calpastatine, *cstn*, grâce à l'existence de différents promoteurs ou d'épissages alternatifs des ARNm (Takano et al., 2000; Parr et al., 2004). Les conséquences physiologiques de ce phénomène ne sont pas bien comprises à l'heure actuelle. Cependant, il a été montré que le promoteur au niveau duquel commence la transcription varie suivant le tissu ou en réponse à certains stimuli, suggérant que les différents isoformes de la calpastatine sont requis suivant le contexte cellulaire (Takano et al., 2000; Sensky et al., 2006). La présence de certains domaines permet de placer les isoformes qui les contiennent sous le contrôle de modifications post-traductionnelles spécifiques. Par exemple la phosphorylation de certains isoformes au niveau de leur domaine L favorise leur libération depuis les agrégats dans le cytoplasme ou module leur activité (Salamino et al., 1997; Averna et al., 2003). En plus de se lier aux calpaïnes pour les inhiber, certains isoformes sont capables d'inhiber partiellement des canaux calciques de type L au sein des cardiomyocytes (Minobe et al., 2006). Ainsi, la génération de différents isoformes de la calpastatine permet de la placer sous le contrôle de plusieurs inducteurs et d'obtenir des protéines dotées de différents modes d'actions.

Les calpaïnes sont impliquées dans le clivage de nombreux substrats, incluant des protéines du cytosquelette (taline, paxilline, vinculine, α -actinine...), des facteurs de transcription (p53, Myc...) et des enzymes (Leloup and Wells, 2011). Une caractéristique des calpaïnes compliquant l'étude de leur implication fonctionnelle est qu'il n'existe pas de site consensus de clivage ou de recrutement des calpaïnes au sein des substrats. La comparaison de plusieurs dizaines de sites de clivages a permis d'identifier certains éléments caractéristiques qui ne sont cependant pas universels (Figure 18). Par exemple le résidu en P2 (deuxième résidu avant le site de clivage) est généralement hydrophobe. Il s'agit souvent d'une leucine (L) ou d'une valine (V). Les résidus P1 les plus fréquents sont la thréonine (T), l'arginine (R), la gluamine (Q), la lysine (K), la glycine (G) ou la sérine (S). Les résidus P1' (premier résidu après le site de clivage) les plus fréquents sont la sérine, la

thréonine (T), la lysine (K), l'arginine (R) et l'alanine (A) (Tompa et al., 2004; duVerle et al., 2010) (voir aussi www.dnbr.ugent.be/prx/bioit2-public/SitePrediction/.)



Figure 18 : Acides aminés constituant préférentiellement les sites de clivage des calpaïnes

Tiré du site www.calpain.org

La grande diversité de substrats des calpaïnes suggère un rôle important dans de nombreux processus biologiques. En effet, l'extinction de la calpaïne-S1 (*cpns-1 -/-*) est létale, suggérant un rôle important de la calpaïne 1, de la calpaïne 2 ou bien des deux. (Arthur et al., 2000; Zimmerman et al., 2000). Confirmant ce résultat, l'extinction de la calpaïne 2 (*cpn2 -/-*) chez la souris est létale avant même l'implantation des embryons (Dutt et al., 2006). Les mutants délétés pour la calpaïne 1 sont par contre viables et fertiles (Azam et al., 2001), suggérant que la calpaïne 1 ne joue aucun rôle lors du développement embryonnaire ou bien que la calpaïne 2 compense la perte de la calpaïne 1. Les calpaïnes ont également été associées à certaines pathologies (Zatz and Starling, 2005). Ainsi, une activité calpaïne plus importante dans les cellules nerveuses accompagne les maladies neurodégénératives comme Alzheimer (Yamashima, 2013). Les calpaïnes font également partie des acteurs principaux impliqués dans les infarctus du myocarde. En effet, le phénomène d'ischémie-reperfusion subi par les cellules entraîne une surcharge de calcium dans le cytoplasme menant à l'activation des calpaïnes. Celles-ci entraînent le dysfonctionnement des myocytes en dégradant les protéines contractiles ainsi que des composants de la chaîne respiratoire mitochondriale, aboutissant à une perte des cellules en ATP. Elles induisent également la mort cellulaire en activant, par leur clivage, des protéines pro-apoptotiques comme Bid (Neuhof and Neuhof, 2014). Les phénomènes d'ischémie-reperfusion sont également à l'origine de l'activation des calpaïnes dans les cellules nerveuses en cas d'attaque cérébrale (Yamashima and Oikawa, 2009). Les calpaïnes ont également été impliquées dans plusieurs types de dystrophies musculaires : des mutations inactivatrices de la calpaïne 3 sont à l'origine de l'accumulation de fibres anormales menant à la mort des myocytes dans la dystrophie des ceintures tandis que, dans les dystrophies de

Duchenne et de Becker, l'absence de dystrophine entraîne une perturbation de l'homéostasie calcique des myocytes à l'origine d'une activité excessive des calpaïnes (Tidball and Spencer, 2000; Gallardo et al., 2011). L'expression et l'activité des calpaïnes est aussi augmentée dans des échantillons de patients atteints de sclérose en plaque, suggérant un rôle dans cette maladie (Shields et al., 1999),

B) Implication des calpaïnes dans le cancer

L'établissement direct d'un lien entre calpaïnes et cancer remonte à la deuxième moitié des années 90. En effet, il est alors montré dans une cohorte de cancers du rein que l'expression de la calpaïne 1 est plus élevée dans les tumeurs présentant un phénotype invasif (envahissement des ganglions lymphoïdes) (Braun et al., 1999). Cependant, l'expression des calpaïnes n'est pas augmentée dans certains carcinomes de la peau (Reichrath et al., 2003) et elle est même diminuée dans une cohortes de cancers de l'endomètre (Salehin et al., 2010).

Ces résultats divergents pourraient être expliqués par le fait que l'activité des calpaïnes, plus que leur expression, est importante dans la tumorigenèse. En effet, il a été montré que l'expression de la calpaïne 1 et de la calpaïne 2 diminue dans une lignée de rhabdomyosarcome par rapport à des myoblastes sains. Cependant, en parallèle, l'expression de la calpastatine diminue drastiquement. Il en résulte une activité augmentée des calpaïnes, à l'origine des propriétés migratoires et invasives de ces cellules (Roumes et al., 2010). En accord avec cette hypothèse, l'activité des calpaïnes est augmentée dans les cancers du sein œstrogène-dépendants par rapport aux tissus sains (Shiba et al., 1996) et dans certains cancers du système nerveux, une activité plus importante des calpaïnes induit l'inactivation par clivage du gène suppresseur de tumeur Merlin (Kimura et al., 2000).

A l'échelle cellulaire, les calpaïnes sont impliquées dans plusieurs phénotypes comme la migration ou le contrôle de la balance survie-mort cellulaire. A l'heure actuelle, il est bien avéré qu'en dérégulant le phénotype de migration et d'invasion, elles favorisent la progression tumorale et la formation de métastases.

Il est à noter que la distinction entre les rôles de chaque calpaïne, notamment de la calpaïne 1 et de la calpaïne 2, a été réalisée grâce à des expériences de surexpression mais pas d'inhibition. En effet, il n'existe pas d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant individuellement les différents membres de cette famille. La plupart des inhibiteurs sont des dérivés peptidiques ciblant le site actif des calpaïnes, comme l'ALLN, l'ALLM ou la calpeptine. Ce site actif étant très similaire pour toutes les calpaïnes, il en résulte l'inhibition

de tous les membres de cette famille de protéases (Carragher, 2006). Les seules exceptions sont une classe de composés non peptidiques, les α -mercaptoacrylates, qui ciblent les domaines régulateurs DIV et DVI et inhibent donc spécifiquement les calpaïnes classiques sans modifier l'action des calpaïnes atypiques (Wang et al., 1996). De plus, récemment, Abbot Pharceutical a développé des carbomaxides qui ciblent la calpaïne 1 avec une forte spécificité (Kling et al., 2010).

1) Calpaïnes, migration et invasion cellulaire

a. Les calpaïnes gouvernent la dynamique des points focaux d'adhésion

En 2004, il est montré que la surexpression de différents oncogènes (v-Src, v-Myc, K-Ras, v-Jun et v-Fos) dans des fibroblastes embryonnaires de poulet induit une augmentation de l'activité des calpaïnes et que celle-ci joue un rôle important dans la transformation de ces cellules ainsi que dans l'augmentation de leur motilité. Cette action des calpaïnes repose au moins en partie sa capacité à réguler, par clivages protéolytiques, les protéines du cytosquelette constituant les points focaux d'adhésion (Carragher et al., 2004).

Les points focaux d'adhésion sont des édifices moléculaires permettant l'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire. Ils sont composés d'intégrines, dont la partie extracellulaire se fixe à la matrice tandis que la partie intracellulaire lie le cytosquelette par l'intermédiaire de protéines adaptatrices comme la taline, la vinculine ou l'alpha actinine. Les points focaux d'adhésions permettent la progression des cellules qui l'utilisent comme une prise pour se hisser le long de la matrice extracellulaire grâce à leur cytosquelette. Une fois à l'arrière de la cellule, les points focaux d'adhésion se désassemblent afin de permettre son avancée (Storr et al., 2011a).

De façon paradoxale, les calpaïnes sont à la fois impliquées dans l'assemblage des points focaux d'adhésion à l'avant des cellules et dans leur dégradation à l'arrière (Figure 19). En effet, dans des expériences d'adhérence cellulaire, l'inhibition des calpaïnes ralentit la formation des points focaux d'adhésion et donc l'adhésion des cellules à leur support. Dans des expériences miroirs la surexpression de la calpaïne 1 augmente le nombre de points de contacts entre les cellules et leur substrat (Potter et al., 1998; Bialkowska et al., 2000). Le modèle proposé est que la calpaïne 1 est recrutée là où les points focaux d'adhésion se forment, notamment au niveau des filopodes et des lamellipodes, les protrusions les plus en avant des cellules en cours de migration. Elle active indirectement les protéines de signalisation Rac et Rho, qui gouvernent l'assemblage d'intégrines. Rac, Rho et

les intégrines recrutent ensuite d'autres intégrines et des protéines adaptatrices, permettant de consolider l'assemblage initial en de réels points focaux d'adhésion (Kulkarni et al., 1999; Bialkowska et al., 2000). La calpaïne 2, quant à elle, régule la stabilité des protrusions formées par les cellules. En effet, l'extinction de son expression augmente la dynamique de formation et de régression des lamellipodes, diminuant ainsi leur stabilité (Franco et al., 2004a). La calpaïne 2 assure sa fonction en clivant des substrats impliqués dans la formation des protrusions cellulaires comme la cortactine qui active la polymérisation de l'actine (Perrin et al., 2006).

A l'arrière des cellules, les calpaïnes, notamment la calpaïne 2, clivent d'autres substrats comme de nombreux composants des points focaux d'adhésion (taline, paxilline, FAK...). Les mécanismes permettant d'expliquer la différence entre le rôle des calpaïnes à l'avant et à l'arrière des cellules ne sont actuellement pas bien compris. Cependant, ce processus est nécessaire au détachement du substrat et à la migration des cellules (Beckerle et al., 1987; Carragher et al., 1999; Franco et al., 2004b). Par conséquent, l'inhibition des calpaïnes ralentit la vitesse de migration des cellules sur leur substrat (Huttenlocher et al., 1997). Le recrutement de la calpaïne 2 à l'arrière des cellules est, au moins dans certaines situations, médié par les voies de signalisation induite par la MAPKinase MEKK1. Cette MAPKinase est elle-même en aval de certains récepteurs membranaires comme l'EGFR. Ainsi, la dégradation des points focaux d'adhésion à l'arrière des cellules est un phénomène important pour les propriétés chimiotactiques des facteurs de croissance comme l'EGF, et l'inhibition de ce processus abolit les capacités pro-migratoire de ces facteurs de croissance (Glading et al., 2001; Cuevas, 2003).

b. Les calpaïnes favorisent l'invasion

Si l'activité des calpaïnes est importante pour les capacités migratoires de lignées cellulaires cancéreuses (Mamoune et al., 2003; Carragher et al., 2004; Xu and Deng, 2006a), elles sont aussi impliquées dans leur aptitude à envahir un substrat, comme du collagène ou des constituants de la matrice extracellulaire, grâce à un déplacement tridimensionnel. Certaines populations cellulaires progressent de façon relativement homogène et en dégradant la matrice extracellulaire. Ce type de mouvement est nommé invasion mésoenchymateuse (Wolf et al., 2003; Carragher et al., 2006). En plus de leur effet sur la migration, les calpaïnes participent à ce type de mouvement en activant des protéases comme MMP1, MMP2 et urokinase Plasminogen-type Activators (uPAs) qui dégradent la matrice extracellulaire (Postovit et al., 2002; Popp et al., 2003; Fan et al., 2009). De manière intéressante, la nicotine ou l'un de ses dérivés, le 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-

butanone, augmentent la migration et les capacités invasives de cellules issues de cancers pulmonaires et ces effets sont dépendants de l'activation des calpaïnes. De plus, ils stimulent la sécrétion des calpaïnes, qui pourraient alors être directement impliquées dans la digestion de la matrice extracellulaire (Xu and Deng, 2004, 2006b).

Etant donné leur rôle dans les phénotypes d'invasion, l'inhibition des calpaïnes pourrait constituer une perspective thérapeutique intéressante mais certaines études ont d'ores et déjà montré les limites d'une telle stratégie. En effet, en réponse à l'inhibition des calpaïnes, les cellules cancéreuses sont capables de mettre en place un autre mode d'invasion, l'invasion (ou migration) amiboïde. Ce type d'invasion implique un rétrécissement et un arrondissement des cellules. Il est indépendant des intégrines et des calpaïnes et a lieu en absence de dégradation de la matrice extracellulaire. Certaines lignées cancéreuses, comme des lignées de mélanome ou de cancer du côlon, utilisent d'ailleurs constitutivement ce mode d'invasion (Wolf et al., 2003; Carragher et al., 2006).

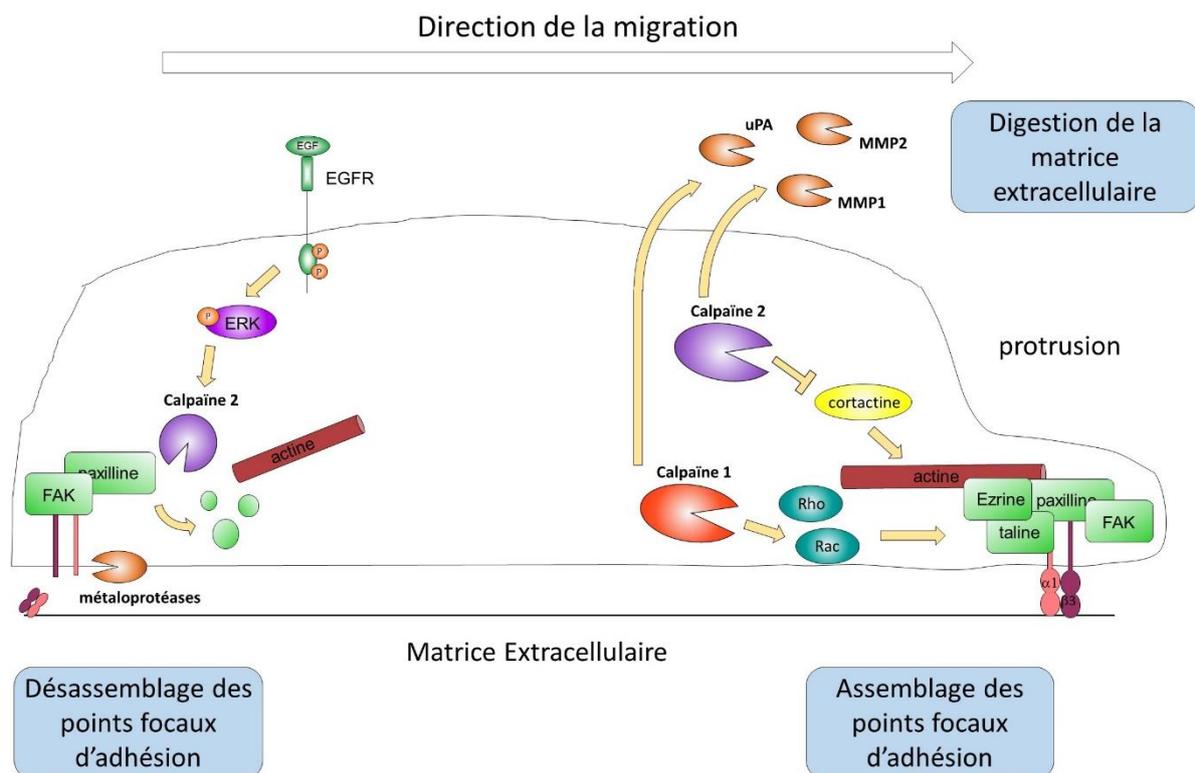


Figure 19 : Rôle des calpaïnes dans la migration cellulaire
D'après (Friedl and Wolf, 2003) et (Storr et al., 2011a)

2) Calpaïnes et angiogènèse

Des études récentes ont impliqué les calpaïnes dans l'angiogènèse tumorale. En effet, le VEGF, une cytokine induisant de fortes réponses d'angiogènèse, augmente l'expression et l'activité de la calpaïne 2 dans des cellules endothéliales microvasculaires. Cette augmentation est nécessaire aux réponses de migration, de tubulogènèse ou d'angiogènèse *in vivo* induites par le VEGF (Su et al., 2006). De plus, il a été démontré dans des lignées tumorales que l'hypoxie induit le clivage d'une protéine du cytosquelette, la filamine A, par des calpaïnes. Ce clivage génère un fragment intracellulaire fonctionnant comme un co-facteur de HIF-1 α et favorisant son activité transcriptionnelle (Zheng et al., 2014). Ainsi, en plus de participer directement au remodelage des protéines du cytosquelette nécessaires à l'organisation des cellules endothéliales en nouveaux vaisseaux sanguins, les calpaïnes participent indirectement à l'activation du programme génétique pro-angiogénique induit par des conditions environnementales comme l'hypoxie.

Il a été proposé que les calpaïnes puissent être des cibles thérapeutiques pour les traitements anti-angiogéniques. Cependant, ce type de stratégies devrait spécifiquement cibler les calpaïnes impliquées dans l'angiogènèse, comme la calpaïne 2. En effet, d'autres calpaïnes, comme la calpaïne 1, ont un rôle anti-angiogénique. Ainsi, il a été montré que la calpaïne 1 joue un rôle dans la régression de vaisseaux sanguins en favorisant la perte d'adhésion et l'apoptose des cellules endothéliales (Bodnar et al., 2009).

L'utilisation de certaines chimiokines pourrait représenter une stratégie possible pour cibler les calpaïnes de manière spécifique. Par exemple le facteur IP-10 (CXCL-10) et l'un des isoformes de son récepteur, CXCR3-B, ont une action anti-angiogénique. Ils inhibent la calpaïne 2 *via* l'activation de la PKA et induisent l'activation de la calpaïne 1 (Bodnar et al., 2006, 2009). Cependant l'autre isoforme du récepteur, CXCR3-A, induit une réponse inverse (pro-angiogénique) en favorisant la survie des cellules endothéliales. Les futures molécules antagonistes de CXCR3 devront donc être spécifiques de certaines isoformes.

C) Calpaïne, survie et mort cellulaire : un rôle ambivalent

Bien que les calpaïnes aient aussi été impliquées dans les phénomènes de survie et de mort cellulaire, leur rôle dans ces réponses biologiques n'est pas clairement établi. Alors que certaines études suggèrent un rôle pro-survie des calpaïnes, d'autres montrent que leur

activité est particulièrement importante dans l'activation de voies de signalisation menant à la mort cellulaire (Figure 21).

1) Les calpaïnes favorisent la survie cellulaire

A la fin des années 1990, l'importance des calpaïnes pour la survie des lignées issues de leucémies ou de lymphome est démontrée. En effet, des inhibiteurs de calpaïnes induisent efficacement l'apoptose de ces cellules (Zhu and Uckun, 2000; Witkowski et al., 2002). Dans des lignées tumorales solides exprimant une version sauvage de p53, les calpaïnes semblent également impliquées dans la survie cellulaire en dégradant p53 afin de prévenir son accumulation : des inhibiteurs de calpaïnes induisent sa stabilisation, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Atencio et al., 2000). Cependant, dans des cellules neuronales embryonnaire, il a au contraire été montré que les calpaïnes permettent de manière indirecte la stabilisation de p53 et l'induction de la mort cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN, bien que les mécanismes à l'origine de cet effet n'aient pas été identifiés (Sedarous et al., 2003). Les calpaïnes peuvent aussi favoriser la stabilisation du facteur de transcription pro-survie NF- κ B. En effet, elles sont capable de dégrader son inhibiteur, I κ B α , en réponse à des signaux comme la cytokine TNF α (Han et al., 1999) ou à l'activation d'ErbB2 (Pianetti et al., 2001). Les calpaïnes peuvent aussi induire la résistance de cellules cancéreuses aux traitements. Par exemple la calpaïne-S1 favorise la survie de lignées issues de cancers du sein au trastuzumab. Son extinction est nécessaire à l'inhibition de la phosphorylation de ErbB2 par le trastuzumab et amplifie l'apoptose induite par le traitement (Kulkarni et al., 2012).

2) Les calpaïnes relaient des signaux pro-apoptotiques

a. L'apoptose dépendante des caspases

Bien que certaines études montrent une implication des calpaïnes dans les réponses de survie, celles-ci peuvent induire l'apoptose par d'autres mécanismes impliquant par exemple un stress du réticulum endoplasmique ou une augmentation de la concentration en calcium du cytoplasme. Un tel processus peut être déclenché par de nombreux inducteurs : des situations de stress comme la privation en sérum (Tan et al., 2006) ou des situations d'hypoxie (Nakagawa and Yuan, 2000), des inhibiteurs des pompes calciques du réticulum endoplasmique de type thapsigargine (Martinez et al., 2010) ou encore des agents

chimiothérapeutiques (Liu et al., 2008). Les calpaïnes alors activées induisent ou facilitent l'apoptose grâce au clivage activateur de protéines effectrices comme les caspases, Bax ou Bid.

Par exemple l'utilisation de sels de platinium comme le cisplatine dans des lignées de cancer du poumon induit le clivage activateur de Bid par les calpaïnes. Ainsi activée, Bid se relocalise au niveau des mitochondries et induit leur perméabilisation, le relargage de cytochrome c dans le cytoplasme induisant l'activation de caspases comme la caspase 3 (Liu et al., 2008). Dans les cellules HeLa, l'oxaloplatine induit la même réponse (Anguissola et al., 2009). De même, l'étoposide peut induire le clivage de Bax dans sa partie N-terminal (résidu D33) pour générer un fragment de 18k Da, p18 Bax, permettant d'amplifier l'apoptose. p18 Bax se lie de manière compétitive avec le Bax pleine longueur à l'inhibiteur d'apoptose Bcl-x_L, permettant de surmonter son effet anti-apoptotique (Gao and Dou, 2000; Cao et al., 2003; Cartron et al., 2004). La thapsigargine, au moins dans certaines lignées cellulaires, entraîne une augmentation de la concentration en calcium cytoplasmique induisant l'activation des calpaïnes puis des caspases 2, 3, 7 et 12 (Martinez et al., 2010). Certaines molécules de la famille des flavinoïdes, une famille de pigments végétaux, induisent également une apoptose dépendante des calpaïnes : une étude a en effet montré que le traitement de lignées issues de cancers du sein avec la génistéine induit le clivage activateur de la caspase 12 par la calpaïne 1 suite à l'augmentation de la concentration en calcium dans le cytoplasme. Une autre étude réalisée dans le même type cellulaire a mis en évidence un clivage activateur de la caspase 7 par les calpaïnes et, indépendamment de ces événements, l'activation de la voie de la p38 MAPKinase (Sergeev, 2004; Shim et al., 2007). L'activation de la caspase 12 a également été observée dans des lignées d'hépatocarcinomes suite à un traitement par la génistéine mais est médié par la calpaïne 2. Enfin, dans des lignées mammaires, d'autres flavinoïdes, comme le resveratol et le HL-37, induisent une augmentation de la concentration en calcium cytoplasmique suivie de l'activation des calpaïnes puis des caspases (Sareen et al., 2007; Xie et al., 2008).

Il a également été montré que les caspases peuvent cliver la calpastatine afin de l'inactiver. Ainsi, l'induction de l'apoptose induit, dans différentes lignées, le clivage par les caspases de la calpastatine en deux fragments inactifs de 75kDa et 30kDa. Ces clivages ont lieu dès les premières étapes de l'apoptose et il est possible qu'ils permettent ainsi d'amplifier l'action des calpaïnes (Wang et al., 1998). Dans ces modèles cellulaires, un dialogue entre calpaïnes et caspases permettrait donc une action synergique de ces deux familles de protéases. Ce phénomène a également été mis en évidence dans le cadre de recherches agroalimentaires sur l'attendrissement de la viande : peu après l'abatage, les caspases dégradent la calpastatine, permettant d'augmenter l'activité des calpaïnes,

considérées comme les principaux acteurs de cet attendrissement (Chen et al., 2012; Huang et al., 2014).

Le lien entre calpaïnes et apoptose a également été étudié dans le cadre de la résistance de certains cancers du sein à un anticorps monoclonal ciblant le récepteur ErbB2, le trastuzumab. Cependant, l'étude suggère un rôle opposé pour les calpaïnes suivant que le type cellulaire est sensible ou résistant au trastuzumab. En effet, dans une lignée tumorale mammaire sensible au trastuzumab, l'activité de la calpaïne 1 favorise l'apoptose induite par cet anticorps : la calpaïne 1 clive le récepteur ErbB2, inhibant au moins partiellement sa signalisation, et favorise l'activation du gène suppresseur de tumeur PTEN par des mécanismes non identifiés. La protéine Akt et les réponses de survie en aval sont ainsi inhibées. Cette double action des calpaïnes n'induit pas directement l'apoptose mais, en inhibant efficacement les signaux de survie transmis par l'axe ErbB2-PI3K/Akt, sensibilise les cellules aux agents chimiothérapeutiques (Kulkarni et al., 2010). De manière intéressante, dans des cellules résistantes au trastuzumab, l'action des calpaïnes semble modifiée : au lieu de médier l'apoptose, elles favorisent au contraire la survie cellulaire. Dans ces cellules résistantes, les calpaïnes ne clivent plus ErbB2 et, au lieu de diminuer la phosphorylation d'Akt, elles participent au maintien de son activité. Ces observations suggèrent une modification des substrats des calpaïnes mais ceux-ci n'ont pas été identifiés (Kulkarni et al., 2010). L'importance de la calpaïne 1 dans l'acquisition de résistances au trastuzumab a été confirmée au niveau clinique puisque, dans une cohorte de patientes, l'expression de la calpaïne 1 corrèle effectivement avec une survie globale nettement moins bonne alors que presque aucune des patientes exprimant de faibles quantités de calpaïnes ne présente de rechute pendant les 30 mois de suivi (Storr et al., 2011b).

b. L'apoptose indépendante des caspases.

Bien que les calpaïnes puissent activer les effecteurs classiques de l'apoptose en réponse à des agents toxiques, elles ont également été impliquées dans un autre type de mort cellulaire programmée reposant sur le passage de la protéine AIF (Apoptosis Inducing Factor) des mitochondries vers le noyau. Cette mort cellulaire est indépendante des caspases est considérée, suivant les équipes, comme de l'apoptose indépendante des caspases ou une forme de nécrose programmée (Moubarak et al., 2007; Liu et al., 2009a; Galluzzi et al., 2012).

Dans les cellules saines, l'AIF est enchâssée dans la membrane interne des mitochondries et régule la chaîne respiratoire mitochondriale grâce à ses fonctions antioxydantes (Delavallée et al., 2011). Suite à un traitement par certains agents alkylants de

l'ADN comme le cisplatine ou le MNNG, l'AIF peut être clivé par des calpaïnes mitochondriales, notamment la calpaïne 1 mitochondriale, entre les résidus L103 et S104. Ce clivage sépare la partie N-terminale d'AIF, toujours enchâssée dans la membrane, de la partie C-terminale devenue ainsi soluble (Polster et al., 2005; Moubarak et al., 2007; Liu et al., 2009a). La forme clivée d'AIF, tAIF (truncated AIF), quitte la mitochondrie en passant par des pores formés par la protéine Bax (Moubarak et al., 2007). Elle se relocalise ensuite dans le noyau et induit une dégradation de l'ADN indépendante des caspases, la chromatolyse. L'action apoptotique de tAIF repose principalement sur son extrémité C-terminale. Récemment, il a été montré que la présence d'un domaine riche en prolines au sein de cette région permet l'association de tAIF avec la protéine histone phosphorylée H2AX. Le complexe tAIF-H2AX induit la chromatolyse selon des mécanismes encore à élucider. Il a par contre été montré que la cyclophiline A est indispensable à leur action (Artus et al., 2010).

Le phénomène d'apoptose indépendante des caspases est encore peu défini. Bien qu'il puisse être induit par les mêmes agents que l'apoptose dépendante des caspases, comme les agents alkylants, il semble que la puissance du stress détermine la réponse : alors que de faibles concentrations induisent une réponse classique d'apoptose dépendante des caspases, de plus fortes concentrations sont nécessaires à l'activation de l'apoptose dépendante d'AIF (Moubarak et al., 2007).

3) Les calpaïnes inhibent l'autophagie et orientent les cellules vers l'apoptose...

L'autophagie permet aux cellules de recycler les éléments vieillissants au sein des cellules, par exemple les protéines dénaturées ou les organites dysfonctionnels. Ces éléments sont recyclés de manière sélective : par exemple la mitophagie permet de recycler les mitochondries qui dysfonctionnent et perdent leur potentiel de membrane, l'ER-phagie de recycler des portions du réticulum endoplasmique suite à un stress subi par cet organite. Pour cela, une machinerie protéique complexe, comprenant les protéines de la famille Atg, induit l'empaquetage de portions du cytoplasme dans des vacuoles délimitées par une double membrane. Cet autophagosome fusionne avec des lysosomes et les éléments contenus à l'intérieur sont dégradés en composés prêts à être réutilisés. Le rôle de l'autophagie dans la tumorigenèse est toujours débattu. D'un côté, l'autophagie pourrait avoir un rôle suppresseur de tumeur : elle permet l'élimination de composés cytotoxiques et potentiellement carcinogènes, limite la production de ROS en éliminant les mitochondries endommagées et peut induire la mort de cellules anormales. Cependant, l'autophagie

pourrait également favoriser la transformation en favorisant la survie, notamment des cellules cancéreuses, face à des conditions de stress comme un faible apport en nutriments, un phénomène observé dans les zones tumorales mal irriguées (Ravikumar et al., 2010).

A partir de la seconde moitié des années 2000, un lien est établi entre les calpaïnes et l'autophagie. La première étude à établir ce lien montre que le clivage d'Atg5 par les calpaïnes génère un fragment capable de faciliter la libération du cytochrome c dans le cytosol en inhibant l'action de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L. En effet, Bcl-x_L empêche la perméabilisation des mitochondries en se fixant et en inhibant la formation de pores mitochondriaux par Bax. Le fragment d'Atg5 se lie à BCL-x_L et pourrait ainsi l'empêcher d'inhiber l'action de Bax. Dans cette étude, l'activité des calpaïnes limite donc l'autophagie pour favoriser l'apoptose (Yousefi et al., 2006). Dans des cellules nerveuses, il a été montré que les calpaïnes limitent l'autophagie et favorisent ainsi la mort cellulaire suite à des stress comme l'excitotoxicité, c'est-à-dire la stimulation excessive de récepteurs de neurotransmetteurs, un phénomène courant dans les attaques cérébrales (Xu et al., 2007). En effet, l'excitotoxicité active des calpaïnes *via* l'ouverture de canaux membranaires calciques de type L. Les calpaïnes clivent la sous-unité α de la protéine G (G α) en un fragment C-terminal de 20kDa qui, constitutivement activé, induit une augmentation du taux d'AMPc capable d'inhiber l'autophagie (Sato-Kusubata et al., 2000; Williams et al., 2008).

4) ... ou induisent l'autophagie et protègent les cellules contre l'apoptose

Alors que les études décrites précédemment mettent en évidence l'implication des calpaïnes dans l'inhibition de l'autophagie et la promotion de l'apoptose, d'autres données suggèrent au contraire un rôle pro-autophagie des calpaïnes. En effet, la déplétion en sérum ou le traitement de fibroblastes avec la céramide ou la rapamycine induit une réponse d'autophagie dépendante des calpaïnes permettant de limiter l'apoptose. Lorsque ces cellules sont déplétées en calpaïne-S1, la réponse d'autophagie est réduite tandis que l'apoptose est amplifiée (Demarchi et al., 2006). De même, l'inhibition des calpaïnes par des agents pharmacologiques dans une lignée issue de sarcome augmente l'apoptose induite par l'oridonine et réduit l'autophagie (Cheng et al., 2008). Il a également été décrit qu'en condition de stress nutritionnel ou hypoxique, le produit du clivage de Myc par les calpaïnes favorise la survie cellulaire au moins en partie en stimulant l'autophagie. En effet, les calpaïnes clivent Myc après la lysine 298 (VLK²⁹⁸-R). Le fragment N-terminal généré par ce clivage, Myc-nick, est dénué du site de localisation nucléaire ainsi que du domaine de liaison à l'ADN de c-Myc. Il reste dans le cytoplasme où il s'associe à des protéines du

cytosquelette comme l' α -tubuline, dont il augmente la stabilité en induisant son acétylation par GCN5. Myc-nick induit également l'acétylation de protéines de la famille Atg. L'acétylation de ces substrats est nécessaire à la fusion des autophagosomes avec les lysosomes et, en favorisant ce processus, Myc-nick amplifie le phénomène d'autophagie (Conacci-Sorrell et al., 2010, 2014). Enfin, les calpaïnes pourraient être impliquées dans la résistance de certaines cellules leucémiques aux ITKs ciblant le domaine kinase de la protéine Abl. En effet, elles réalisent le clivage de la β -caténine en un fragment de 75kDa qui se relocalise dans le noyau et y exerce une activité transcriptionnelle. Bien que les gènes cibles de ce fragments n'aient pas été identifiés, son expression corrèle avec l'augmentation des flux autophagiques dans les cellules et pourraient donc induire une meilleure résistance aux ITKs (Rios-Doria et al., 2004; Mancini et al., 2014).

L'implication des calpaïnes dans l'autophagie, et notamment dans la balance apoptose-autophagie a été démontrée mais son rôle exact n'est pas encore clairement déterminé. Alors que le clivage de certains substrats favorise l'apoptose, d'autres fragments générés par les calpaïnes participent à la protection contre la mort des cellules en favorisant l'autophagie. La façon dont l'ensemble de ces signaux s'intègre dans des cellules cancéreuses est à l'heure actuelle mal comprise. Des recherches supplémentaires, notamment sur des modèles *in vivo* et dans des cohortes de patients restent nécessaires pour déterminer plus clairement le rôle des calpaïnes vis-à-vis de l'autophagie.

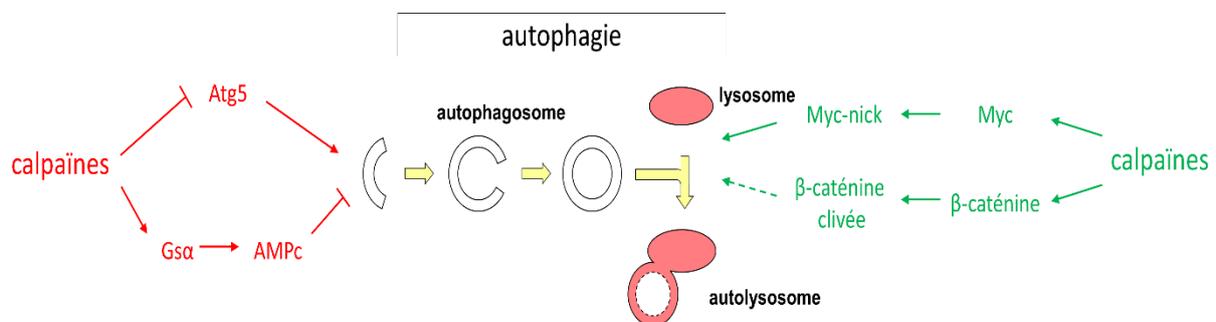


Figure 20 : Liens entre calpaïnes et autophagie

Ce schéma représente les deux modes d'action des calpaïnes sur l'autophagie. Gauche – les calpaïnes peuvent inhiber l'autophagie et favoriser l'apoptose en inactivant par clivage protéolytique la protéine Atg5 ou en favorisant la production d'AMPC par la sous-unité α de la protéine G. Droite – les calpaïnes peuvent favoriser l'autophagie via le clivage de Myc en Myc-nick ou la production d'un fragment de la β -caténine, p75. D'après (Ravikumar et al., 2010).

5) Les calpaïnes, sont impliquées dans la nécrose

Les calpaïnes sont également impliquées dans des phénomènes de mort cellulaire nécrotique, qui ne présentent pas les caractéristiques classiques de l'apoptose comme la

relocalisation de la phosphatidylsérine au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique ou la formation de corps apoptotiques. Elles se caractérisent notamment par une perte de l'intégrité d'un ou plusieurs types d'organites et une rupture précoce de la membrane plasmique induisant la libération de protéines cytoplasmiques dans le milieu extracellulaire. Contrairement à l'apoptose qui est un phénomène actif, la nécrose se caractérise par une perte rapide de l'ATP des cellules (Yamashima, 2013; Garcia-Dorado et al., 2012; Lai et al., 2014b). Comme des agents pharmacologiques ou l'extinction de certains gènes peuvent protéger les cellules de la nécrose, celle-ci est désormais considérée comme une mort cellulaire régulée (Galluzzi et al., 2014).

a. De nombreux stimuli induisent la nécrose

La nécrose régulée des cellules peut être déclenché par différents agents ou conditions de stress. C'est le cas de protéines cytotoxiques, comme le peptide A β qui s'accumule au sein des cellules nerveuses lors de la maladie d'Alzheimer (Citron, 2004). Des composés chimiques comme l'acétaminophène (paracétamol) ou le chlorure de carbone (CCl₄) peuvent également induire la nécrose des hépatocytes et provoquer une insuffisance hépatique aiguë (Hinson et al., 2010). Un phénomène d'ischémie, c'est-à-dire une privation d'oxygène et de nutriments, induit aussi la nécrose au sein d'organes subissant un infarctus, notamment le cœur (cardiomyocytes) ou le cerveau (cellules nerveuses). La reperfusion, c'est-à-dire le retour brusque d'oxygène aux organes en situation d'ischémie, amplifie fortement ce phénomène (Garcia-Dorado et al., 2012; Lai et al., 2014b). Enfin, des molécules ionophores de calcium, l'ionomycine ou l'A23187, sont également capables d'induire une mort nécrotique (Francis et al., 2013; Yun et al., 2014).

De manière intéressante, ces agents peuvent également, suivant les conditions, induire l'apoptose. Les paramètres favorisant un type de mort cellulaire plutôt qu'un autre ne sont à l'heure actuelle pas forcément bien compris. L'état énergétique de la cellule est l'un des facteurs de décision entre apoptose et nécrose (Eguchi et al., 1997). A l'échelle d'un organe, ces stimuli pro-nécrotiques induisent aussi une certaine proportion d'apoptose dans les organes en souffrance. Ainsi, dans des cellules nerveuses en situation d'ischémie, les calpaïnes semblent capables d'induire l'apoptose en activant la caspase 3 ou bien en favorisant le relargage d'AIF par les mitochondries (Blomgren et al., 2001; Cao et al., 2007). Cependant, certaines études ont montré que le clivage de la caspase 3 par les calpaïnes pouvait être inactivateur (Neumar et al., 2003), ou dispensable pour la mort cellulaire (McCollum et al., 2002). Dans le cas de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, une faible proportion des cellules mortes observées dans des coupes de cerveau de patients

décédés ou de modèles animaux présente une morphologie apoptotique, même si la majorité présente une morphologie nécrotique (Velez-Pardo et al., 2001; Yamashima et al., 2003; Müller et al., 2014). Dans le cas de l'action toxique de l'acétaminophène au sein du foie, certains rapports indiquent une mort nécrotique à 99% (Gujral et al., 2002) tandis que d'autre détectent une proportion de cellules apoptotique pouvant aller jusqu'à 40% des cellules mourantes (Ray et al., 1996).

Les différents stimuli présentés ont pour point commun l'augmentation de la concentration en calcium dans le cytoplasme et une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'espèces réactives de l'azote (RNS). Ces espèces sont impliquées dans la mort cellulaire et la perméabilisation mitochondriale. Ce dernier point est important pour potentialiser leur effet et leur permettre d'induire la mort cellulaire

b. La perméabilisation mitochondriale renforce les signaux pro-nécrotiques

ROS, RNS et calcium agissent comme des seconds messagers qui déclenchent la perméabilisation mitochondriale *via* l'ouverture du PTP (Permeability Transition Pore). Comme décrit précédemment, l'ouverture du PTP peut médier l'apoptose mais elle peut aussi amplifier la nécrose.

En effet, en réponse à une augmentation anormale de la concentration en calcium cytoplasmique, les mitochondries peuvent absorber une partie de ce calcium dans leur matrice *via* la présence de canaux voltage-dépendents V-DACs (Voltage-Dependant Anion Chanel) au niveau de la membrane externe et d'un pore appelé MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter) au niveau de la membrane interne (Rizzuto et al., 2012). En cas de stress calcique intense, une trop forte concentration de calcium mitochondrial induit l'ouverture du PTP. D'autres paramètres comme l'augmentation de la concentration en groupements Pi et les ROS ont été identifié comme des éléments favorisant l'ouverture du PTP en abaissant la quantité de calcium requise (Halestrap and Richardson). Une fois ouvert, le PTP permet l'équilibration des solutés de moins de 1,5 kDa entre le stroma et l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Ce phénomène induit une dissipation du gradient de protons créé par la chaîne respiratoire et nécessaire au bon fonctionnement de l'ATP-synthase, induisant ainsi la déplétion en ATP de la cellule en même temps qu'une augmentation du taux de groupements phosphate inorganique (Pi) non intégrés à l'ADP. De plus, la chaîne respiratoire, découplée de la production d'ATP, produit un excès de ROS. Enfin, l'ouverture du PTP induit aussi une entrée d'eau provoquant le gonflement de la matrice mitochondriale et le dépliement de la membrane interne, à l'origine de la rupture de la membrane externe et

du déversement dans le cytosol du contenu mitochondrial cytotoxique, notamment du calcium (Batandier et al., 2004; Halestrap, 2010).

Les protéines composant le PTP n'ont toujours pas été déterminées avec exactitude. Le seul membre clairement identifié à l'heure actuelle est la cyclophiline D (CypD). En effet, l'utilisation d'un inhibiteur connu de CypD, la cyclosporine A, permet d'inhiber la perméabilisation mitochondriale induite par une surcharge en calcium (Connern and Halestrap, 1992; Crompton et al., 1988). Des MEFs issues de souris KO pour la cyclophiline D ne subissent pas non plus cette perméabilisation et présentent une résistance à la mort cellulaire induite par une surcharge en calcium ou des ROS (Nakagawa et al., 2005). D'autres membres potentiels du PTP ont été proposés, comme le canal membranaire voltage-dépendant V-DAC ou l'échangeur d'ATP/ADP ANT (Adenine Nucleotide Channel) mais l'utilisation de modèles animaux KO pour ces protéines suggère qu'ils ne sont pas indispensables à la formation du pore et jouerait plutôt un rôle régulateur (Morciano et al.).

L'ouverture du PTP joue un rôle important dans la nécrose puisque son inhibition par la cyclosporine A protège des cellules nerveuses de peptides A β cytotoxiques et que des cellules KO pour la cyclophiline D sont résistantes à une surcharge en calcium ou un excès de ROS (Nakagawa et al., 2005; Piot et al., 2008).

c. Les calpaïnes comme effecteurs de la nécrose

En plus de leur rôle dans la perte d'intégrité des mitochondries, le calcium, les ROS et les RNS sont également des effecteurs directs de la nécrose. Le calcium induit notamment l'activation des calpaïnes, dont le rôle va plus spécifiquement être décrit. En effet, celles-ci clivent de nombreux substrats membranaires, cytoplasmiques ou encore des protéines du cytosquelette, participant ainsi à l'arrêt du métabolisme, au dysfonctionnement de nombreux processus cellulaires et à la fragilisation des structures membranaires.

Par exemple en condition d'hypoxie, les calpaïnes accroissent l'activité de canaux calciques membranaires par clivage : le clivage de certains canaux calciques voltage-dépendants de classe L élague l'extrémité C-terminal pour générer des canaux quatre fois plus actifs et le clivage de mGluR1 α , un récepteur du neurotransmetteur NMDA, génère une forme tronquée de l'extrémité C-terminal toujours perméable au calcium mais qui n'a plus la capacité d'activer des voies de survie comme la voie des PI3Kinase/Akt. (Hell et al., 1996; Xu et al., 2007).

Les calpaïnes clivent aussi des protéines du cytosquelette comme la spectrine ou la tubuline, altérant à la fois la structure et la fonction des cellules. Ainsi, la spectrine est l'une des cibles principales des calpaïnes. Elle recouvre la face interne et supporte la membrane

plasmique. Son clivage par les calpaïnes en fragments de 150 et 145 kDa induit sa perte d'activité. Ce phénomène est précoce, il est caractéristique de l'activation des calpaïnes et il est détecté dans de nombreux contextes cellulaires, laissant supposer qu'il est ubiquitaire : en effet, le clivage par les calpaïnes de la spectrine est observé dans les cellules nerveuses ou cardiaques en situation d'hypoxie, dans des cellules nerveuses traitées avec des protéines cytotoxiques comme le peptide A β ou encore dans des hépatocytes exposés à des agents toxiques comme l'APAP. De ce fait, le clivage de la spectrine est utilisé comme un marqueur de l'activité des calpaïnes (Vanderklis and Bahr, 2000; Limaye et al., 2003; Czogalla and Sikorski, 2005; Wei et al., 2008). La tubuline est une autre protéine du cytosquelette ciblée par les caspases. Son clivage génère des fragments s'assemblant de manière aberrante *in vitro* et il est vraisemblable que ceux-ci perturbent les microtubules dans les cellules (Billger et al., 1988). En réponse au peptide cytotoxique A β , les calpaïnes participent aussi à la dégradation de la dynamine par clivages protéolytiques. La dynamine est nécessaire au recyclage des vésicules synaptique, un phénomène clé dans le traitement des informations et la mémoire et son extinction entraînerait un dysfonctionnement des cellules nerveuses (Kelly et al., 2005).

Les calpaïnes peuvent aussi, en clivant certaines classes de protéines telles que des kinases ou certaines hydrolases, participer à la production de fragments cytotoxiques. Par exemple en condition d'ischémie, le clivage de l'hydrolase CRMP3 (Collapsin Response Mediator Protein 3), une protéine impliquée dans la croissance des neurites et des axones, favorise la mort des cellules nerveuses (Hou et al., 2006, 2013). Dans la maladie d'Alzheimer, les calpaïnes activent par leur clivage des kinases comme ERK ou la PKC, et favorisent ainsi l'hyperphosphorylation de la protéine tau et son agrégation en plaques entraînant un dysfonctionnement des neurones (Shea et al., 1996; Veeranna et al., 2004).

Alors que la nécrose induite par certains inducteurs comme des agents toxiques (APAP, ionomycine, A23187) ou l'ischémie est assez rapide et survient en quelques heures (Limaye et al., 2003; Yun et al., 2014), la progression des cellules vers la mort est lente dans le cas des maladies neurodégénératives. Dans ces cellules, les clivages réalisés par les calpaïnes induirait, au moins dans un premier temps, un dysfonctionnement des neurones plutôt que de leur mort (Kelly et al., 2005; Vosler et al., 2008). Cependant, l'activation des calpaïnes finit par induire la rupture des lysosomes via le clivage de HSP70.1, une protéine nécessaire au maintien de l'intégrité des lysosomes. La rupture des lysosomes induit le déversement des protéases lysosomales, les cathépsines, dans le cytoplasme ainsi que l'acidification de ce compartiment et orienterait irréversiblement les cellules vers la nécrose. L'inhibition des cathépsines, protège d'ailleurs efficacement de la mort cellulaire déclenchée par des

inducteurs tels que l'ischémie, confirmant leur implication (Yamashima et al., 1998, 2003; Sahara and Yamashima, 2010; Yamashima, 2013).

Lors de morts cellulaires non apoptotiques, les calpaïnes clivent donc de nombreux substrats. Elles ciblent principalement des protéines du cytosquelette nécessaires au bon déroulement du trafic intracellulaire ainsi qu'à l'intégrité de la membrane plasmique, des récepteur membranaires qui, ainsi suractivé, induisent une augmentation de calcium dans les cellules, des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité d'organites comme les lysosomes ou encore des protéines dont le produit de clivage est neurotoxique. L'ensemble de ces clivages participe à la fragilisation des cellules et à l'altération de leur fonctionnement. Il est à noter qu'en plus des substrats cités, les calpaïnes clivent de nombreuses autres protéines, dont certaines sont spécifiques du type cellulaire ainsi que de l'inducteur de nécrose. Une description exhaustive de ces substrats est répertoriée dans la revue de (Vosler et al., 2008).

d. Importance relative des calpaïnes dans la nécrose

Comme les calpaïnes agissent en parallèle d'autres effecteurs tels que les ROS et les RNS, leur importance réelle dans le phénomène de nécrose est difficile à estimer. Cependant, dans certains modèles, leur action semble non négligeable. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de calpaïnes protège des cellules nerveuses de la mort induite par les produits des peptides cytotoxiques et atténue le développement de la maladie d'Alzheimer dans un modèle de souris (Vaisid et al., 2007, 2008). Dans le cas de la nécrose du foie, bien que l'importance des ROS et RNS ait été amplement étudiée (Hinson et al., 2010), il a été montré qu'un inhibiteur des calpaïnes ou la surexpression de la calpastatine favorisent la survie de souris traitées avec une forte dose de CCl₄ ou d'acétaminophène et limitent la propagation des zones nécrotiques au sein du foie (Limaye et al., 2003, 2006).

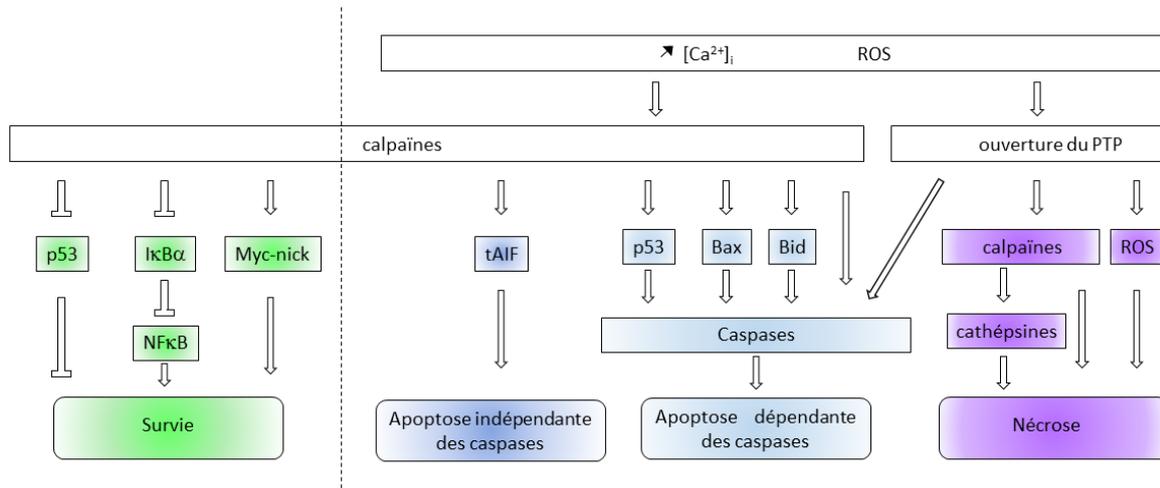


Figure 21 : Implication des calpaïnes dans la survie et les différents types de mort cellulaire

Gauche - Dans les cellules cancéreuses, les calpaïnes favorisent la survie (gauche du schéma) en inactivant par clivage des protéines pro-apoptotiques comme p53 ou IκB, l'inhibiteur du facteur de survie NFκB. Droite - A la suite de stress cellulaires induisant une augmentation de la concentration en calcium dans le cytoplasme, les calpaïnes peuvent induire l'apoptose, dépendante ou indépendante des caspases en activant des effecteurs tels que p53, Bax, Bid, les caspases ou tAIF. Une augmentation de la concentration en calcium peut induire la perméabilisation mitochondriale par ouverture du PTP. L'ouverture du PTP favorise l'apoptose. Enfin, des stress cellulaires peuvent également induire la nécrose des cellules, au moins en partie par l'ouverture du PTP, la production de ROS et l'activation des calpaïnes. Les calpaïnes clivent de nombreux substrats et peuvent induire la libération des cathépsines dans le cytoplasme et leur participation à la mort cellulaire. Adapté de (Moretti et al., 2014).

e. La nécrose médiée par les calpaïnes dans le cancer

Le rôle de ce type de nécrose régulée a peu été étudié dans le cancer. Il est cependant connu que des ionophores du calcium comme l'ionomycine ou le A23187 peuvent induire une forte surcharge calcique accompagnée d'une mort indépendante des caspases dans des lignées issues de tissus sains ou cancéreux, y compris des cellules résistantes à l'apoptose (Francis et al., 2013; Curry et al., 2013; Yun et al., 2014). Un stress calcique généré par la thapsigargine et habituellement pro-apoptotique peut aussi induire la nécrose dans des cellules résistantes à l'apoptose : en effet dans des fibroblastes KO pour Bak et Bax ou des lignées cancéreuses présentant également l'extinction de ces gènes, un stress calcique déclenché par la thapsigargine n'induit plus l'apoptose mais une mort cellulaire indépendante des caspases et caractérisée par une absence d'externalisation de phosphatidylsérine et une rupture précoce de la membrane plasmique. Ces différents résultats suggèrent que des inducteurs capables d'induire un stress calcique seraient toujours efficaces dans le traitement de cancers présentant certains types de résistance à

l'apoptose, comme un déficience en Bak et Bax, et donc résistants à de nombreux traitements (Janssen et al., 2009).

Les ionophores du calcium étant connus comme des inducteurs des calpaïnes, l'implication de ces protéases dans ce type de mort cellulaire est vraisemblable. En effet, dans des fibroblastes de souris, l'utilisation d'EGTA semble apporter une protection partielle contre la nécrose induite par le composé A23187, bien que la cyclosporine A ou des inhibiteurs de protéases à sérine favorisent la survie de manière plus marquée (Yun et al., 2014). Cependant, la mort cellulaire induite par les ionophores du calcium ainsi que le rôle exact des calpaïnes dans ce type de mort cellulaire reste peu étudié à l'heure actuelle. Etant donné leur potentiel comme voie alternative chez les cellules déficientes en certains effecteurs majeurs de l'apoptose, comprendre les mécanismes caractérisant la mort cellulaire induite par stress calcique représente un enjeu important pour l'élaboration de futures thérapies.

Les calpaïnes sont donc une famille de protéases cytoplasmiques dépendantes du calcium impliquées dans de nombreuses réponses cellulaires. Plutôt que de dégrader totalement leurs substrats, elles exercent dessus une hydrolyse ménagée et les clivent au niveau de sites spécifiques. Ces clivages, parfois considérés comme des modifications post-traductionnelles irréversibles, permettent d'inactiver les substrats, de les activer ou bien de générer des fragments dotés de nouvelles fonctions. Le rôle des calpaïnes dans la cancérogenèse est assez ambigu. En effet, leur implication dans la migration et l'invasion cellulaire a clairement été démontré. Par contre, leur rôle dans la balance survie-apoptose est moins bien compris. Si les calpaïnes semblent favoriser la survie cellulaire, leur suractivation par de nombreux agents thérapeutiques est nécessaire aux réponses de mort cellulaire.

Mon travail de thèse a permis d'identifier le récepteur Met comme un nouveau substrat des calpaïnes. En effet, le récepteur Met est clivé par les calpaïnes au niveau de son site juxtamembranaire dans deux situations différentes. Tout d'abord, la présence de la mutation R970C ou une forte confluence mènent à la génération d'un fragment intracellulaire de 45kDa qui semble contribuer à la dispersion et à la motilité cellulaire. A l'inverse, le récepteur Met peut aussi être clivé par les calpaïnes suivant un fort stress calcique. Dans ces conditions de mort cellulaire indépendante des caspases, il est efficacement dégradé en un fragment N-terminal relargué dans le milieu extracellulaire et un fragment C-terminal d'environ 40 kDa. Ces deux situation pour Met sont en résonance avec le rôle global des calpaïnes dans la régulation de la migration et de la balance survie-mort.

RESULTATS

I. La mutation R970C induit un clivage aberrant du récepteur Met

A) Résumé de la publication 1 et étude du clivage de Met en p45 Met induit par la mutation R970C

A mon arrivée au laboratoire, mon équipe avait démontré que la zone juxtamembranaire du récepteur Met est la cible de clivages protéolytiques comme le PS-RIP ou les clivages par les caspases. Plusieurs mutations ont été séquencées au sein de cette région, notamment dans des cancers du poumon. Cependant, le mécanisme d'action de ces mutations n'est pas clairement établi. En effet, ces mutations ne modifient pas l'activité kinase de Met (Tyner et al., 2010). Cependant, la xéno greffe à des souris immunodéficientes de NIH-3T3 exprimant les versions mutées P991S et T992I de Met induit la formation d'un plus grand nombre de tumeurs que des NIH-3T3 transfectées par du Met sauvage (Lee et al., 2000). De plus une étude de génétique fonctionnelle a associé la plus grande susceptibilité aux cancers du poumon de la lignée de souris SWR/J à la mutation R968C, l'équivalent chez la souris de la mutation R970C (Zaffaroni et al., 2005). Notre objectif a donc été de déterminer si ces mutations avaient une influence sur les clivages protéolytiques du récepteur Met. Nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur les mutations R970C, en raison de son lien avec la sensibilité accrue aux cancers du poumon de la lignée de souris SWR/J, la mutation T992I, qui est la mutation juxtamembranaire la plus fréquente, et la mutation P9991S, située juste à côté.

Les résultats obtenus ont été rapportés en détail dans la publication 1 actuellement en révision dans Journal of Thoracic Oncology.

Brièvement, des clones exprimant stablement des versions mutées du récepteur Met ont été générés en cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), une lignée issue de cellules épithéliales de chien non cancéreuses. Historiquement, cette lignée a été très utilisée par les équipes travaillant sur le récepteur Met. Elle présente des réponses à l'HGF/SF marquées. De plus, certains anticorps permettant de détecter le récepteur Met humain ne se lient pas au récepteur endogène des MDCK, permettant de détecter spécifiquement le récepteur Met transfecté. A mon arrivée au laboratoire, les clones exprimant le Met R970 étaient déjà prêts, j'ai ainsi pu me consacrer à la préparation des autres clones.

Dans un premier temps, j'ai déterminé si les mutations juxtamembranaires étudiées induisent une activation constitutive du récepteur. En effet, des résultats divergents ont été

obtenus par plusieurs équipes, notamment pour la mutation T992I. L'activation du récepteur Met induit des réponses phénotypiques comme la dispersion des cellules épithéliales, qui en l'absence d'activation de Met, s'organisent en îlots de cellules étroitement liées. Dans notre modèle, les mutations juxtamembranaires n'induisent pas de dispersion. En contrôle positif, nous avons utilisé un clone exprimant stablement un récepteur Met contenant une mutation activatrice du domaine kinase bien caractérisée, la mutation M1250T. Ces cellules sont constitutivement dispersées, validant la fiabilité de l'expérience.

Nous avons ensuite cherché à évaluer l'effet de ces mutations sur les clivages connus du récepteur Met. Le traitement des clones par la staurosporine, un inducteur d'apoptose bien connu, provoque la mort des cellules ainsi que l'activation des caspases et la dégradation des différentes versions de Met en p40 Met caspases. Ces résultats sont cohérents avec le fait que ces mutations ne modifient pas le site de clivage de Met par les caspases. L'analyse de lysat de cellules non traitées par Western blot montre aussi qu'aucune des mutations juxtamembranaires n'entraîne l'expression constitutive des fragments de Met générés par PS-RIP, Met-CTF et Met-ICD. Ces deux fragments ne sont observables qu'après traitement des cellules avec un inhibiteur de la γ -sécrétase (le composé E), de la voie lysosomale (la bafilomycine) ou du protéasome (la lactacystine). L'utilisation de ces inhibiteurs stabilise les fragments CTF et ICD dans les mêmes proportions pour chaque version du récepteur Met. Ainsi, les mutations juxtamembranaires étudiées ne semblent pas modifier les clivages déjà connus du récepteur Met.

De manière intéressante, la transfection transitoire de Met R970C induit la génération d'un nouveau fragment d'environ 45 kDa, nommé p45 Met. Le même fragment est observé dans les cellules NCI-H1437, une lignée de cancer du poumon exprimant un allèle muté R970C. En cherchant à déterminer si d'autres paramètres pouvaient influencer la production de p45 Met, j'ai pu démontrer que sa production est favorisée par une forte densité cellulaire et, dans une moindre mesure, par l'EGF. L'HGF, par contre, inhibe la production de p45 Met, suggérant que le fragment p45 Met n'est pas produit à partir de récepteur Met activé. J'ai ensuite cherché à identifier la protéase réalisant le clivage de Met en p45 Met. L'utilisation d'inhibiteur des principales familles de protéases a permis de mettre en évidence l'implication de protéases à cystéines, et plus précisément des calpaïnes.

Des expériences de fractionnement cellulaire des NCI-H1437 ont montré une localisation nucléaire et mitochondriale du fragment. L'accumulation spécifique de p45 Met dans ces organites suggère que ce fragment, plutôt que d'être un intermédiaire de dégradation, pourrait avoir un rôle actif. Afin d'identifier la fonction de p45 Met, j'ai pu tirer profit de clones exprimant stablement une version de Met commençant à l'acide aminé C970 et liée à une étiquette FLAG en N-terminal générés en cellules MDCK avant mon arrivée au laboratoire.

Dans ce modèle, des expériences d'immunofluorescence confirment la localisation nucléaire du fragment. Cependant, contrairement aux résultats obtenus par fractionnement cellulaire, aucune localisation mitochondriale n'a été détectée. Du point de vue morphologique, aucune différence n'a été observée entre les clones stables et leur lignée d'origine. Leur réponse de prolifération est également inchangée. Cependant, la dispersion des clones stables en réponse à l'HGF/SF est augmentée. De même, des expériences de suivi de trajectoire de cellules individuelles par vidéomicroscopie montrent une motilité accrue des clones stables. Le fragment p45 Met semble donc impliqué dans les capacités migratoires des cellules.

Publication 1: Met receptor variant R970C of lung cancer induces its aberrant proteolytic cleavage

Rémi MONTAGNE, Anne BARANZELLI, Ghaffar MUHARRAM, Catherine LEROY, Elisabeth Werkmeister, Zoulika KHERROUCHE, Arnaud LEMIERE, Alexis B. CORTOT and David TULASNE.

Met receptor variant R970C of lung cancer induces its aberrant proteolytic cleavage

Rémi MONTAGNE¹, Anne BARANZELLI^{1,2}, Ghaffar MUHARRAM³, Catherine LEROY¹, Zoulika KHERROUCHE¹, Elisabeth Werkmeister^{1,4}, Arnaud LEMIERE¹, Alexis B. CORTOT^{1,2} and David TULASNE¹.

¹ CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille - Institut Pasteur de Lille - Université de Lille Nord de France, SIRIC ONCOLille, Lille 59021, France.

² Service de Pneumologie et Oncologie Thoracique, CHRU de Lille, Université de Lille Nord de France, Lille, France

³ Institut Curie, UMR144, Team Cell invasion and migration, Paris, France

⁴ BioImaging Center Lille Nord de France, Lille 59021, France

Keywords: Lung cancer, Met, Receptor tyrosine kinase, Hepatocyte growth factor/scatter factor, Proteolytic cleavages, Mutation, Caspase, Secretase, Calpain.

Running title: Proteolytic cleavage of Met R970C

Corresponding Author: David Tulasne, CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille - Institut Pasteur de Lille, Université de Lille Nord de France, 1 Rue Pr Calmette, BP447, 59021 Lille, France

The authors declare that there are no conflicts of interest

Acknowledgments

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 "Institut National du Cancer", the "Cancéropôle Nord-Ouest" and the "Site de Recherche Intégrée sur le Cancer, SIRIC ONCOLille". We thank the Microscopy-Imaging-Cytometry Facility of the BioImaging Center Lille Nord-de-France for access to instruments and technical advice.

Abstract

The receptor tyrosine kinase Met and its ligand, the hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF), are essential to embryonic development, whereas deregulation of Met signaling is associated with tumorigenesis leading to various cancers, including lung carcinoma. Mutations in the kinase domain of Met lead to constitutive kinase activity and are associated with tumorigenesis. In lung cancer, however, mutations are found in the juxtamembrane domain, and their functional consequences are unknown. Because the juxtamembrane domain of Met is targeted by several proteolytic cleavages, all involved in Met degradation during cell death or under steady-state conditions, we evaluated the influence of these mutations on the proteolytic cleavage of Met. In stably transfected epithelial cells expressing human Met, the juxtamembrane mutations R970C, P991S, and T992I were found not to modify the known caspase or presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis of Met. Yet when overexpressed, the R970C variant caused generation of an as yet undescribed 45-kDa fragment (p45 Met). This fragment was found also in the lung cancer cell line NCI-H1437 carrying the R970C mutation, and confluence favored its generation. Like other intracellular Met fragments, p45 Met localized to the nucleus and mitochondria. Generation of p45 Met required the activity of the aspartic protease calpain, confirming the involvement of proteolysis. Ectopic expression of reconstituted p45 Met in MDCK cells favored cell scattering and motility indicating active role of this fragment in HGF/SF induced responses. Hence, although the juxtamembrane mutations of Met do not affect its known proteolytic cleavages, the R970C Met variant undergoes aberrant proteolytic cleavage in lung cancer cells.

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) (1). HGF/SF and Met are essential to embryonic development, since knockout of either one affects epithelial organ, placenta, muscle, and neuron formation (2-5). Conditional knockout of Met in the lung inhibits alveolar development, a possible consequence of decreased alveolar epithelial cell (AECII) proliferation and survival (6). In adults, the HGF/SF-Met pair is involved in physiological processes such as epidermal healing and liver regeneration (7-9).

Upon ligand binding and subsequent Met dimerization, several tyrosine residues in the intracellular portion become phosphorylated, allowing recruitment of cytoplasmic proteins involved in activating multiple intracellular signaling pathways (10, 11). Downregulation of the Met receptor is an essential negative regulatory mechanism preventing receptor oversignaling. Besides the well-known ligand-dependent degradation of Met, notably involving lysosomal degradation of the ubiquitinated receptor, we have demonstrated that Met undergoes several proteolytic cleavages also involved in downregulation of the receptor. Under apoptotic conditions, Met is cleaved by caspases within the juxtamembrane and C-terminal domains. These cleavages separate the extracellular ligand-binding domain from the intracellular kinase domain (12-15), inactivate the receptor, and create a 40-kDa intracellular fragment (p40 Met) that can amplify cell death by promoting mitochondrial permeabilization (16). Under steady-state conditions, Met is processed by Presenilin-Regulated Intramembrane Proteolysis (PS-RIP). This proteolytic process involves a first cleavage by membrane ADAM metalloproteases, leading to generation of a membrane-anchored p55 Met fragment degraded by the lysosome (17). This fragment is further cleaved by γ -secretase, yielding a p50 Met fragment degraded by the proteasome (18). These cleavages contribute to decreasing the half-life of the receptor and to preventing its accumulation in the membrane through generation of labile intracellular fragments.

Aberrant Met and HGF/SF signaling is involved in promoting tumorigenesis and metastasis. In a significant number of human cancers, HGF/SF and Met are overexpressed (1). About half of all non-small-cell lung cancers (NSCLCs) overexpress Met. This overexpression is associated with poor prognosis (19-21). In addition, in about 5-20% of the NSCLCs displaying a mutated Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) gene, acquired resistance to EGFR inhibitors involves amplification of the *met* gene, leading to its strong overexpression and activation (22). In a variety of cancers, furthermore, many Met mutations have also been discovered. In renal cancers, Met mutations are located mainly in the kinase domain, causing constitutive kinase activity. In lung cancers, Met mutations are found in 3 to 10% of cases according to the ethnic origin (23), but in contrast to those found in renal cancers, they are located in the extracellular and juxtamembrane regions. The mutation N375S is the most common with a frequency between 6 and 14% according the ethnic groups (23, 24). This variant is located within the extracellular Sema domain involved in the interaction with the

HGF/SF. The three mutations R970C, P991S, and T992I (respectively R988, P1009, and T1010 in the long isoform of Met) are less frequent (with about 1% of the patients for the R970C variant for instance) and are all located within the juxtamembrane domain (23). In contrast to mutations in the kinase domain, it is unknown how they affect Met functionally. While studies have demonstrated that they favor the growth of experimental tumors, they do not cause Met kinase activation (25-27). In addition, although these mutations were initially identified in lung tumors, recent studies have demonstrated that they are in fact germline mutations that might correspond to polymorphisms (23, 24, 27, 28). The N375S variant of the Sema domain, present in 14% of the Asian population, is not a susceptibility or prognosis factor for lung cancer (24). Yet in the mouse strain SWRJ, the R968C Met variant, corresponding to the human R970C variant, favors the development of lung tumors, suggesting that it modifies Met activity through an unknown mechanism (29). It is thus important to understand the functional consequences of these Met mutations.

Because caspases and γ -secretases Met cleavages target the juxtamembrane domain, we have sought to evaluate how the juxtamembrane mutations found in lung tumors affect proteolysis. We demonstrate that the R970C, P991S, and T992I variants do not affect the known caspase and PS-RIP proteolytic cleavages of the receptor. Yet we further show that the R970C mutation leads to generation of a novel 45-kDa fragment (p45 Met). In lung cancer cell lines carrying the R970C mutation, we show that generation of this fragment is regulated by cell density and involves proteolytic cleavage by aspartic proteases. Furthermore, expression of the reconstituted fragment in epithelial cells favors scattering and motility induced by HGF/SF. Our results thus demonstrate that a juxtamembrane mutation of Met can lead to aberrant proteolytic Met cleavage in lung cancer cells leading to generation of an active fragment.

Materials and methods

Cytokines, drugs, and cell cultures

The caspase inhibitor QVD-FMK was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Staurosporin was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). The H⁺-pump inhibitor bafilomycin A1 was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). The proteasome inhibitor lactacystin was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). The γ -secretase inhibitor Compound E was purchased from Alexis/Coger (Lausen, Switzerland). The calpain inhibitors ALLN and calpeptin and the cathepsin inhibitors Cati-1 and CatIB 2 were purchased from Calbiochem. The aspartyl protease inhibitor pepstatin, the trypsin serine protease inhibitor TLCK, the chymotrypsin serine protease inhibitor TPCK, and the cysteine protease inhibitors E64 and EST were purchased from Calbiochem. Human recombinant HGF/SF was purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA).

Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells and MDA-MB-231 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen) and 1% antibiotics (10000 U/ml penicillin - 10000 μ g/ml streptomycin, Invitrogen). NCI-H1437 and MCF-7 were cultured in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% FCS and antibiotics. Cells were cultured at 37°C in a water-saturated 5% CO₂ atmosphere.

Antibodies

Mouse monoclonal antibody directed against human Met (#3148), rabbit monoclonal antibody directed against EGF Receptor (C74B9), mouse monoclonal antibody directed against phospho-EGF Receptor (Tyr1068) and rabbit polyclonal antibody directed against the phosphorylated tyrosine (Y 1234/1235) of Met (#3126) were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Mouse monoclonal antibody against the kinase domain of Met (3D4) was purchased from Invitrogen. Mouse monoclonal antibody against lamin B2 (33-2100) was purchased from Zymed. Mouse monoclonal antibody against GAPDH (6C5-32233), rabbit polyclonal antibody against the C-terminal domain of human PARP-1 (H250), and antibody against ERK2 (C14) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Mouse antibody against **cytochrome-c oxidase subunit 4 (20E8) was purchased from Abcam (Cambridge, MA, USA)**. Green-fluorescent Alexa fluor 488 conjugated anti-mouse IgG (H+L) and phalloidin – Alexa Fluor 546 were purchased from Invitrogen. Rabbit polyclonal antibodies against the Flag epitopes were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA).

Plasmid constructs

The vector expressing full-length human Met was constructed as follows. The sequences encoding WT human Met and the kinase-dead Met K1108A variant, previously described (13), were cut

out of PRS2 hu Met (kindly provided by Dr G. Vande Woude, Van Andel Research Institute, MI, USA) by EcoRI restriction and cloned into the pCAGGS vector (kindly provided by Dr P. Mehlen, Centre Léon Bérard, Lyon, France).

Expression vectors for human WT Met and for the N930S, R970C, P991S, and T992I Met variants were constructed as follows. Mutations were created with the QuickChange site-directed mutagenesis system of Stratagene, using pRS2-human Met as a template and the following primers:

N930S: 5'-GTTCAACCAGATCAGAGTTTCACAGGATTG and

3'-CAATCCTGTGAAACTCTGATCTGGTTGAAC

R970C: 5'-GCAGTGAATTAGTTTGCTACGATGCAAGAG and

3'-CTCTTGCATCGTAGCAAATAATCACTGC

P991S: 5'-GCCCCAAGTGTAAGCTCAACTACAGAAATG and

3'-CATTTCTGTAGTTGAGCTTACACTTCGGGC

T992I: 5'-CGAAGTGTAAGCCCAATTACAGAAATGGTTTC and

3'-GAAACCATTCTGTAAATTGGGCTTACACTTCG

The mutated pRS2-Met plasmids were digested with Age-1/Cla and the resulting fragments were subcloned in pCAGGS-Met expression vectors.

Flag-p45 Met was constructed as follows. The human Met fragment was amplified by PCR with the following primers 5'-ATGGATCCTGCTACGATGCAAGAGTACACAC -3' containing a BamHI restriction site and 5'-CGCGCTCGAGCTATGATGTCTCCAGAA-3' containing a XhoI restriction site. The PCR product was subcloned into pcDNA3-Flag between the BamHI and XhoI restriction sites.

Transfections

Transfections of MCF7 and MDCK cells with the reagents polyethylenamine (PEI) Exgen 500 (Euromedex), and Lipofectamine (Invitrogen) were performed as previously described (13). For stable transfections of MDCK cells, two days after transfection, cells were split into four 100-mm dishes containing DMEM-10% FCS, and the next day the medium was supplemented with 800 µg/ml G418 (Gibco). Resistant clones were isolated after 10 days and clones expressing the transfected constructs were selected by western blotting.

RNA interference

For Met silencing, NCI-H1437 cells were harvested. 200,000 cells were incubated with 3 µL Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and mixed with 3 nM of a pool of three stealth siRNAs (Invitrogen) targeting Met [5'-CCAUUUCAACUGAGUUUGCUGUUA-3', 5'-UCCAGAAGAUCAUUUCCUAAUUCA-3', 5'-CCGAGGGAAUCAUCAUGAAAGAUUU-3']. The cells were then plated in a 6-well plate in complete medium.

Western blotting

Western blotting was performed as previously described (30).

Subcellular fractionation

NCI-H1437 cells were collected, washed in PBS, resuspended in buffer (10 mM Tris pH 7.6, 250 mM sucrose, 10 mM KCl, 0.15 mM MgCl₂), and lysed by Dounce homogenization. The suspension was centrifuged at 850 g for 5 min at 4°C to collect the nuclear fraction. The resulting supernatant was centrifuged at 20,000 g for 15 min at 4°C to pellet the mitochondria. The cytosolic fraction (supernatant) was then obtained by centrifugation at 100,000 g for 1 h at 4°C, and cytosolic proteins were precipitated overnight with acetone at -20°C. Each fraction was resuspended in PY buffer and the same amount of protein was solubilized in Laemmli sample buffer.

Immunofluorescence staining

Cells were grown on glass coverslips for 24h, washed, fixed and permeabilized 10min in methanol:acetone (1:1) at -20°C. The cells were washed and blocked 30min in PBS 0.2% casein. The cells were incubated with anti-Flag antibody (1µg/mL) for 1h at room temperature. The cells were washed with PBS and incubated with an Alexa Fluor-conjugated secondary antibody (Alexa Fluor 488 conjugated anti-mouse IgG diluted to 2µg/ml). The cells were washed and the nuclei counterstained with Hoechst 33258. For F-actin staining, cells were incubated with phalloidin-Alexa Fluor 546. Coverslips were mounted with Glycergel mounting medium (Dako, CA). Slides were observed in oil immersion with an AxioImager Z1 (Carl Zeiss), numerical aperture: EC-Plan Neofluar 40x NA 1.3, with an AxioCam mRm camera and Zen Blue acquisition software.

Scattering, motility and proliferation analysis

Microscopy was performed on a Zeiss AxioObserverZ1 fluorescence microscope equipped with a 5x Fluar lens (numerical aperture [NA]0.25), an Axio mRm camera, a Lambda DG4 excitation source (Sutter Instrument Company), a DsRed Filter (Zeiss Filter Set 43HE) and an incubation Unit (XL Unit, Pecon). For time-lapse microscopy, the interior of the incubator surrounding the entire microscope system was heated to 37°C and the CO₂ level was regulated to 5%. 800 cells were labeled with DilC12 (15µg/ml; Becton Dickinson) and seeded in Ibidi 15µ slide 8 wells (GmbH, München, Germany). Images were acquired with the Zen software (Zeiss) at a rate of 1 image per time interval of 10min. The Plugin MTrack2 implemented in the Fiji software (NIH) enabled to obtain the trajectory of each cell. Data were processed with Matlab (Mathworks) to calculate the mean displacement for each cell. For scattering, 2500 cells/well were seeded onto 12-well plates in DMEM-10% FCS. The next day, they were treated or not 24h with 10ng/ml HGF/SF in DMEM-0.5% FCS. Cells were stained with Carazzi's hematoxylin and eosin. Bright-field images were acquired in mosaic mode, thresholded by the Fiji software (NIH) and cells were localized by a maxima detection algorithm. The next steps of

analysis were done with Matlab. After a k-means clustering to individualize clusters, a convex hull detection function enabled to detect the outer border of each cluster and to measure its area. For proliferation, 5000 cells/well were seeded onto 24-well plates in RPMI medium with 10% FCS. Cell proliferation was assessed in triplicate during 4 days after seeding. Cells were counted with Beckman Coulter Z2.

Calpain activity

Cells were lysed in Buffer A (HEPES 10mM pH=7.4, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.5%NP-40). Lysates were clarified by centrifugation at 4°C, and protein concentration was determined with Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, Massachusetts USA). Proteins were diluted at the same concentration in Buffer A and 50µl of each sample were transferred to a 96-well plate. 50µl of calpain substrate Suc-LLVY-AMC (Anaspec, CA USA) diluted at 1:100 in Buffer A were added to each well and fluorescence (Ex/Em=354nm/442nm) was monitored every 5min for 1h at room temperature with a fluorimeter (BMG Labtech FLUOstar OPTIMA). The slopes of the activity curves were calculated and expressed with respect to the control condition.

Results

Met juxtamembrane mutations do not trigger ligand-independent epithelial cell scattering

MDCK canine epithelial cells were stably transfected with a vector expressing the wild-type (WT) human Met receptor or a mutant variant thereof. We chose to express human Met variants in MDCK cells to efficiently detect transfected human construct and potentially generated fragments, since the canine Met receptor is not detected by the antibody directed against human Met. In addition, we previously demonstrated that the proteolytic cleavages of Met including caspase and PS-RIP occurred in these cells (14, 18). The variants tested included juxtamembrane mutants found in lung cancer (R970C, P991S, or T992I) and a kinase domain mutant found in *papillary renal cell carcinoma* (M1250T) (Fig 1A). As expected, MDCK cells seeded at low density organized into small, compact islets. Expression of the M1250T variant, well known to trigger ligand-independent receptor activation, led to cell islet dissociation resembling the scattering triggered by HGF/SF (Fig. 1B). In contrast, MDCK cells expressing WT Met or the R970C, P991S, or T992I variant did not display such scattering. This suggests that these Met variants are not constitutively activated in MDCK cells, as likewise shown previously in other cell types (27). As shown in Figures 2 and 3, the human Met receptors were expressed to comparable levels in the selected clones. It is worth noting that the endogenous canine Met receptor was not recognized by the anti-human Met antibody used for western blotting.

Juxtamembrane mutations do not modify the known proteolytic cleavages of Met

Since Met proteolysis by caspases and PS-RIP occur within the juxtamembrane domain (Fig. 2A), we evaluated whether juxtamembrane mutations modify them. First, MDCK clones expressing juxtamembrane mutants of Met were treated with staurosporin, an inducer of apoptosis. In all MDCK clones, treatment caused cleavage of PARP, a well-described caspase substrate (Fig. 2B), confirming that caspase activity and apoptosis were triggered under these conditions. During apoptosis, as previously shown, Met was cleaved to generate a pro-apoptotic p40 Met fragment. Generation of p40 Met was observed with all the tested Met variants, demonstrating that juxtamembrane mutations do not affect caspase cleavage during apoptosis (Fig. 2).

We next evaluated the effects of Met juxtamembrane mutations on the PS-RIP cleavages involved in receptor degradation under steady-state conditions (17). As expected, treatment of MDCK cells with the lysosomal inhibitor bafilomycin or the γ -secretase inhibitor Compound E stabilized the Met C-terminal fragments (Met-CTF) detected near 55 kDa, generated by Met shedding. This stabilization was increased upon co-treatment with both inhibitors. Treatment with the proteasome inhibitor lactacystin stabilized as well the Met intracellular domain (Met-ICD, about 50 kDa) generated by gamma-secretase cleavage which was however barely detectable (Fig. 3). In MDCK cells

expressing the juxtamembrane Met mutants, the tested treatments similarly stabilized the Met-NTF and Met-ICD fragments, demonstrating that these mutations do not affect cleavage by PS-RIP (Fig. 3). Taken together, these results show that the juxtamembrane mutations R970C, P991S, and T992I do not alter caspase or PS-RIP cleavage of Met.

The R970C mutation promotes generation of a novel fragment, p45 Met

In contrast to MDCK cells stably expressing WT human Met, we found both MDCK and MCF-7 epithelial cells to generate a novel fragment of about 45 kDa when transiently transfected with a vector expressing the R970C variant (Fig 4A and B). This fragment was not detected in cells overexpressing WT, P991S, or T992I Met or the N930S mutant, found in a melanoma cell line (31). This suggests that the R970C mutation may promote heretofore undescribed proteolytic cleavages, generating the 45-kDa fragment, which we have named p45 Met. To assess the involvement of this mutation in generating p45 Met, we evaluated Met expression in NCI-H1437, an NSCLC cell line carrying a monoallelic R970C mutation (Fig. 4C). In NCI-H1437, in addition to the full-length Met, a 45-kDa fragment was easily detected. The level of this fragment was found to increase in cells cultured to high density (Fig. 4D). In MDA-MB231 metastatic breast cancer cells expressing WT Met (Fig. 4C), the p45 Met fragment was not detected, or barely, even at cell confluence (Fig. 4D). Met silencing in confluent NCI-H1437 cells was found to decrease both the Met and 45-kDa bands, indicating that p45 Met is indeed a Met fragment (Fig. 4E). Interestingly, EGF treatment weakly increased p45 Met production (Supplemental Fig. 1A), while HGF stimulation or raising concentration of serum in cell culture medium decreased its generation (Fig. 1 B and C), suggesting that the RTK signaling could differently regulate generation of the fragment in NCI-H1437 cells, but only in a limited extent.

Next, we examined the subcellular localization of p45 Met, having previously shown that Met fragments can localize to intracellular organelles such as the mitochondria (in the case of the p40 Met caspase fragment). In subcellular fractionation experiments performed on NCI-H1437 cells, the p45 Met abundantly produced in high-density cell cultures was detected in both the nuclear and mitochondrial fractions, while it was absent from the cytosolic fraction (Fig. 5).

Aberrant proteolytic cleavage of Met is involved in generating p45 Met

Detection of the p45 Met fragment in NCI-H1437 cells suggests that R970C Met undergoes aberrant proteolytic cleavage. To test this hypothesis, we treated NCI-H1437 cells with various protease inhibitors. Pan-caspase inhibitor Q-VD proved unable to inhibit p45 Met generation in confluent NCI-H1437 cells (Fig. 6A). Similarly, generation of the fragment was unaffected by Compound E, a γ -secretase inhibitor, which as expected efficiently stabilized Met-CTF (Fig 6B). These results demonstrate that caspases and γ -secretase are not involved in p45 Met generation. Next, we treated NCI-H1437 cells with broad-spectrum inhibitors targeting main protease families. EST,

which inhibits cysteine proteases, efficiently inhibited p45 Met generation in a dose-dependent manner, while its non-permeating homolog E64 did not (Fig. 6C). In contrast, inhibitors of acidic or serine proteases did not inhibit fragment production (Supplemental Fig. 2). Since calpains and cathepsins belong to the cysteine protease family, we tested their involvement in p45 Met generation. While cathepsin inhibitor Cati-1 and cathepsin B inhibitor catIB2 were unable to inhibit p45 Met formation (Fig. 6D and E), the calpain inhibitor ALLN proved as effective as EST (Fig 6D). This result was confirmed with calpeptin, another calpain inhibitor (Fig. 6F). Measure of calpain activity with fluorescent calpain substrate showed that, consistently with the increase in p45 Met production, calpain activity is about 3 times higher in confluent NCI-H1437 (Fig. 6G). As expected, calpain inhibitor ALLN drastically decreased calpain activity. Taken together, these results indicate that although juxtamembrane Met mutations do not affect known proteolytic cleavages, the R970C Met variant undergoes aberrant cleavage by a protease of the calpain family.

Ectopic expression of tagged p45 Met fragment increases epithelial cell scattering and motility

In order to evaluate potential role of p45 Met fragment in Met dependent biological responses, we stably expressed in the MDCK epithelial cells, a flag tagged p45 Met fragment from the amino acid C970 to the C-terminal end. We selected two clones expressing flag-p45 Met fragment, detected in western blot with an anti-human Met antibody at an apparent molecular mass close to the p45 Met generated from Met R970C mutant (Fig. 7A). Similar detection was obtained with an anti-flag antibody (data not shown). Immunofluorescence revealed that flag-p45 Met localized mainly in the nucleus as punctuated staining, consistently with detection of p45 Met in nuclear fraction of NCI H1437. However, co-staining of the cells with a mitochondrial dye did not show any mitochondrial localization of the fragment (data not shown). In the two MDCK clones, expression of p45 Met did not modify actin stress fibers organization visualized through phalloidin staining nor their proliferation (Supplementary Fig.S4A and B). However, clones expressing flag-p45 Met displayed increased cell scattering in response to HGF/SF compared to wild type MDCK (Fig. 7C and D). Similarly, video-tracking of single cells showed that the clones expressing flag-p45 Met displayed a higher motility in response to HGF/SF treatment (Fig 7E). As expected, HGF/SF stimulation induced efficient full length Met tyrosine phosphorylation, while it induced very low p45 Met phosphorylation barely detectable at 10 and 30 minutes (Supplementary Fig. S3). Taken together, these results show that p45 Met fragment, localized in nucleus, favors epithelial cells scattering and motility induced by HGF/SF.

Discussion

Met mutations are found in 3-10% of lung cancers and mostly occur within the juxtamembrane and Sema domains. Most of them are germline mutations, which raises the question of whether they are silent polymorphism variants or susceptibility factors for lung cancer. It has recently been shown that in the Asian population, the N375S variant of the Sema domain is neither a

susceptibility nor a prognosis factor for lung cancer (24). Because the juxtamembrane mutations of Met do not cause Met kinase activation, it has been proposed that they are also silent polymorphism variants (27). Nevertheless, other studies have demonstrated that the juxtamembrane Met mutations R970C, P991S, and T992I favor migration and colony formation in soft agar and increase levels of reactive oxygen species, a phenomenon which may participate in cell transformation (26, 32). In addition, the mouse strain SWRJ, producing the R968C Met variant (corresponding to the human R970C variant), displays susceptibility to lung tumor development when exposed to carcinogens (29). Since it is unknown how the R970C mutation affects Met regulation, it may be important to characterize the molecular mechanisms that are modified because of these variants to further understand their involvement in lung tumorigenesis.

We show here that MDCK epithelial cells expressing wild-type, R970C, P991S, or T992I Met do not display constitutive scattering, in contrast to cells expressing the activated-kinase mutant Met M1250T. This confirms that the juxtamembrane mutations do not lead to constitutive activation of the receptor. The absence of constitutive Met activation by the juxtamembrane mutations suggests that other mechanisms that do not directly affect kinase activity could be involved in their deregulation.

We previously demonstrated that the proteolytic cleavages of Met are involved in inactivating the receptor by separating the ligand-binding region from the tyrosine kinase domain. Inhibition of these cleavages could thus favor Met stability and hence Met activation. In ovarian carcinoma, a Met mutation has been found in the C-terminal caspase site (DEVD₁₃₈₀N) (33). By high-throughput sequencing of exomic regions of RTK, furthermore, we recently found in colorectal cancers a Met mutation in the juxtamembrane caspase site (ESVD₁₀₀₃G) (unpublished data). This suggests that inhibition of Met caspase cleavages could be involved in Met deregulation in these cancers. Although Met juxtamembrane mutations in lung tumors do not target the juxtamembrane caspase site or the predicted γ -secretase cleavage site often located in the last amino acids of the transmembrane domain, we hypothesized that these mutations might modify the structure of the domain, thus altering the proteolytic cleavages. We demonstrate here, however, that the juxtamembrane mutations R970C, P991S, and T992I do not abolish Met cleavages by caspases during apoptosis or by secretases under steady-state conditions.

Interestingly, we find that one of the Met variants, the R970C mutant, favors generation of an as yet undescribed 45-kDa fragment. This fragment, initially observed upon overexpression of Met in transiently transfected cells, was also found in lung cancer cell lines NCI-H1437 expressing mutated Met R970C. Generation of the fragment was inhibited by broad-spectrum cysteine protease inhibitors and also by the calpain inhibitors ALLN and calpeptin. This suggests that calpain cysteine proteases are involved in this processing. Inhibition of other cysteine proteases such as caspases and cathepsins did not prevent p45 Met generation. The apparent molecular size of the p45 Met fragment is consistent with a juxtamembrane cleavage occurring near position 970, but it is difficult to predict the exact cleavage site, since consensus amino-acid sequences recognized by calpains have not been described.

Currently, the spatial conformation of a substrate is thought to be a more important factor for calpain cleavage, even though the exact mechanism is still unknown (34). We thus propose that the R970C mutation either creates a novel calpain cleavage site or favors calpain cleavage close to this AA position. Interestingly, tyrosine kinase receptors have recently been predicted to be calpain substrates (35). We also find that cell density increases generation of the p45 Met fragment. Consistently, confluent NCI-H1437 cells display higher calpain activity compare to cells cultured in sparse condition. Such results have already been described for calpain cleavage of Frizzled-7, a G protein coupled receptor involved in cell migration. This cleavage is suggested to be a downregulation mechanism of the membrane pool of Frizzled-7, notably at high cell density, allowing correct turnover of this protein crucial for cell motility (36).

Calpains are a family of cytoplasmic calcium-activated proteases involved in many cellular events. They can promote cell death through cleavage of components of the apoptotic machinery, such as caspases and Bcl-2 family proteins, or, in the context of an altered apoptotic pathway or of strong calcium stress, induce necrosis-like caspase-independent cell death (34, 37, 38). Here, however, no cell death was observed when p45 Met is generated in NCI-H1437 (data not shown). It is noteworthy that calpains can also promote cell survival in response to TNF- α or EGF through cleavage of I κ B α , a potent inhibitor of the pro-survival factor NF κ B. Furthermore, calpain cleavage of focal adhesion proteins allows their turnover, an important step for cell migration (39, 40).

In Met R970C, calpain cleavage within the juxtamembrane domain separates the extracellular ligand-binding region from the intracellular kinase domain. The Met juxtamembrane cleavages by caspases or gamma-secretase likewise separate these functional domains, preventing ligand activation of the receptor (41). Thus, calpain cleavage of Met R970C might be viewed as a downregulation mechanism. We have also previously demonstrated, however, that some intracellular fragments of Met can be active: the p40 Met fragment generated by caspases favors cell death through mitochondrial permeabilization, a crucial step in the apoptotic process (16).

To evaluate the involvement of p45 Met in biological responses induced by full length Met, we ectopically expressed flag-p45 Met fragment in MDCK epithelial cells. We reconstitute the fragment from the mutated cystein residue 970 to the C-terminal end. The apparent molecular mass of the reconstituted fragment is close to endogenous p45 Met confirming that the calpain proteolytic cleavage of Met R970C occurs at or near the mutation. In addition, the flag-p45 Met fragment display clear nuclear localization consistent with fractionation experiment performed with the endogenous p45 Met. While fractionation indicate presence of p45 Met in mitochondrial fraction, transfected flag-p45 Met did not display such detectable localization. Interestingly, we found that ectopic expression of p45 Met in MDCK cells increases cell scattering and motility in response to HGF/SF. In contrast, p45 Met expression did not induce morphological changes or modification of proliferation rate without

HGF/SF stimulation. Full length Met transduces intracellular signaling through its tyrosine phosphorylation notably involved in recruitment of intracellular adaptors. Nevertheless, endogenous p45 Met does not display tyrosine phosphorylation, even following HGF/SF treatment and stably expressed flag-p45 Met fragments displayed only very weak phosphorylation under HGF/SF stimulation, suggesting that it does not promote epithelial cell scattering through the same mechanisms than the phosphorylated full length Met able to induce activation of canonical signaling pathways.

Alternatively, presence of p45 Met in the nucleus leads to propose an active role in this compartment. Indeed, many fragments of membrane receptors, including receptor tyrosine kinases such as ERBB4, can translocate into the nucleus to regulate transcriptional responses (42). In the same line, an intracellular C-terminal fragment of Met fused to the Gal-4 DNA binding domain has been shown to display transactivation properties. This suggests that a nuclear Met fragment might act as a transcription regulator (43). Because p45 Met plays an active role on HGF/SF induced scattering, evaluation of its transcriptional potential might be an important issue.

Besides proteolytic cleavages, the juxtamembrane region of Met is targeted by other negative regulatory mechanisms, involving ligand-dependent phosphorylation. First, in response to HGF/SF, phosphorylation of Met at tyrosine residue 1003 leads to recruitment of the ubiquitin ligase CBL, causing ubiquitination and lysosomal degradation of the receptor (44). Second, ligand stimulation induces phosphorylation of serine residue 985, involved in downregulating Met kinase activity (45). Because the P991S and T992I mutations are located near these negative regulatory sites, it would be interesting to evaluate whether they might affect juxtamembrane phosphorylation in response to the ligand.

Two recent studies have reported that R970C mutant is present in blood samples from healthy people (27) and in samples from normal lung (28), suggesting that R970C mutant could be a polymorphism. However, the low frequency of this variant in healthy people as well as in tumors samples (about 1% in each case) did not allow strong conclusion. Nevertheless, some polymorphisms initially found in tumors samples are susceptibility factors able to promote tumorigenesis. Several arguments are in favor of R970C variant as a susceptibility factor in lung cancer. First, the SWR/J mouse strain, expressing the R968C Met variant, displays susceptibility to lung tumor development when exposed to carcinogens (29). Second, it has been recently shown that ALK-rearranged pulmonary adenocarcinomas display higher frequency of R970C variant (about to 4% compared to 1% in healthy persons), suggesting association between this Met mutation and ALK rearrangement (28). Finally, we demonstrate here that ectopic expression of p45 Met fragment can favor epithelial cells scattering and motility induced by HGF/SF in a tyrosine kinase activity-independent manner. Taken together, aberrant cleavage of Met R970C mutant demonstrates that besides the well-described deregulation of Met kinase activity, unexpected deregulation of other mechanisms could target the Met receptor, enabling it to participate in cell transformation.

References

1. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003 Dec;4(12):915-25.
2. 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(6543):768-71.
3. 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.
4. 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;373:702-5.
5. Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, Davies AM, Klein R. Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes & development* 1997;11(24):3341-50.
6. Calvi C, Podowski M, Lopez-Mercado A, Metzger S, Misono K, Malinina A, et al. Hepatocyte growth factor, a determinant of airspace homeostasis in the murine lung. *PLoS genetics* 2013;9(2):e1003228.
7. Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, Stradal T, Munz B, Werner S, et al. c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol* 2007 Apr 9;177(1):151-62.
8. Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101(29):10608-13.
9. Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Mar 30;101(13):4477-82.
10. 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 Jan;9(1):49-57.
11. 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;77:261-71.
12. Deheuninck J, Foveau B, Goormachtigh G, Leroy C, Ji Z, Tulasne D, et al. Caspase cleavage of the MET receptor generates an HGF interfering fragment. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Mar 14;367(3):573-7.
13. Foveau B, Leroy C, Ancot F, Deheuninck J, Ji Z, Fafeur V, et al. Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ* 2007 Apr;14(4):752-64.
14. 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(23):10328-39.
15. Tulasne D, Foveau B. The shadow of death on the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ* 2008 Mar;15(3):427-34.
16. Lefebvre J, Muharram G, Leroy C, Kherrouche Z, Montagne R, Ichim G, et al. Caspase-generated fragment of the Met receptor favors apoptosis via the intrinsic pathway independently of its tyrosine kinase activity. *Cell death & disease* 2013;4:e871.
17. Ancot F, Leroy C, Muharram G, Lefebvre J, Vicogne J, Lemiere A, et al. Shedding-Generated Met Receptor Fragments can be Routed to Either the Proteasomal or the Lysosomal Degradation Pathway. *Traffic* 2012 Sep;13(9):1261-72.
18. Foveau B, Ancot F, Leroy C, Petrelli A, Reiss K, Vingtdeux V, et al. Downregulation of the Met Receptor Tyrosine Kinase by Presenilin-dependent Regulated Intramembrane Proteolysis. *Mol Biol Cell* 2009 Mar 18;20:2494-506.
19. Olivero M, Rizzo M, Madeddu R, Casadio C, Pennacchietti S, Nicotra MR, et al. Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *British journal of cancer* 1996 Dec;74(12):1862-8.
20. Ichimura E, Maeshima A, Nakajima T, Nakamura T. Expression of c-met/HGF receptor in human non-small cell lung carcinomas in vitro and in vivo and its prognostic significance. *Jpn J Cancer Res* 1996 Oct;87(10):1063-9.
21. Park S, Choi YL, Sung CO, An J, Seo J, Ahn MJ, et al. High MET copy number and MET overexpression: poor outcome in non-small cell lung cancer patients. *Histology and histopathology* 2012 Feb;27(2):197-207.
22. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007 May 18;316(5827):1039-43.
23. Krishnaswamy S, Kanteti R, Duke-Cohan JS, Loganathan S, Liu W, Ma PC, et al. Ethnic differences and functional analysis of MET mutations in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009 Sep 15;15(18):5714-23.

24. Shieh JM, Tang YA, Yang TH, Chen CY, Hsu HS, Tan YH, et al. Lack of association of C-Met-N375S sequence variant with lung cancer susceptibility and prognosis. *International journal of medical sciences* 2013;10(8):988-94.
25. Lee JH, Han SU, Cho H, Jennings B, Gerrard B, Dean M, et al. A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer. *Oncogene* 2000;19(43):4947-53.
26. Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD, et al. c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer research* 2003;63(19):6272-81.
27. Tyner JW, Fletcher LB, Wang EQ, Yang WF, Rutenberg-Schoenberg ML, Beadling C, et al. MET receptor sequence variants R970C and T992I lack transforming capacity. *Cancer Res* 2010 Aug 1;70(15):6233-7.
28. Boland JM, Jang JS, Li J, Lee AM, Wampfler JA, Erickson-Johnson MR, et al. MET and EGFR mutations identified in ALK-rearranged pulmonary adenocarcinoma: molecular analysis of 25 ALK-positive cases. *J Thorac Oncol* 2013 May;8(5):574-81.
29. Zaffaroni D, Spinola M, Galvan A, Falvella FS, Pazzaglia S, Saran A, et al. Met proto-oncogene juxtamembrane rare variations in mouse and humans: differential effects of Arg and Cys alleles on mouse lung tumorigenesis. *Oncogene* 2005 Feb 3;24(6):1084-90.
30. Paumelle R, Tulasne D, Leroy C, Coll J, Vandebunder B, Fafeur V. Sequential activation of ERK and repression of JNK by scatter factor/hepatocyte growth factor in madin-darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2000;11(11):3751-63.
31. Puri N, Ahmed S, Janamanchi V, Tretiakova M, Zumba O, Krausz T, et al. c-Met is a potentially new therapeutic target for treatment of human melanoma. *Clin Cancer Res* 2007 Apr 1;13(7):2246-53.
32. Jagadeeswaran R, Jagadeeswaran S, Bindokas VP, Salgia R. Activation of HGF/c-Met pathway contributes to the reactive oxygen species generation and motility of small cell lung cancer cells. *American journal of physiology* 2007 Jun;292(6):L1488-94.
33. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011 Jun 30;474(7353):609-15.
34. Storr SJ, Carragher NO, Frame MC, Parr T, Martin SG. The calpain system and cancer. *Nat Rev Cancer* 2011 May;11(5):364-74.
35. Wee LJ, Low HM. SVM-based prediction of the calpain degradome using Bayes Feature Extraction. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2012;2012:5534-40.
36. Struewing IT, Barnett CD, Zhang W, Yadav S, Mao CD. Frizzled-7 turnover at the plasma membrane is regulated by cell density and the Ca(2+) -dependent protease calpain-1. *Exp Cell Res* 2007 Oct 1;313(16):3526-41.
37. Janssen K, Horn S, Niemann MT, Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Fischer U. Inhibition of the ER Ca²⁺ pump forces multidrug-resistant cells deficient in Bak and Bax into necrosis. *J Cell Sci* 2009 Dec 15;122(Pt 24):4481-91.
38. Francis RJ, Kotecha S, Hallett MB. Ca²⁺ activation of cytosolic calpain induces the transition from apoptosis to necrosis in neutrophils with externalized phosphatidylserine. *Journal of leukocyte biology* 2013 Jan;93(1):95-100.
39. Han Y, Weinman S, Boldogh I, Walker RK, Brasier AR. Tumor necrosis factor-alpha-inducible IkappaBalpha proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem* 1999 Jan 8;274(2):787-94.
40. Pianetti S, Arsura M, Romieu-Mourez R, Coffey RJ, Sonenshein GE. Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of IkappaB-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN. *Oncogene* 2001 Mar 15;20(11):1287-99.
41. Lefebvre J, Ancot F, Leroy C, Muharram G, Lemiere A, Tulasne D. Met degradation: more than one stone to shoot a receptor down. *Faseb J* 2012 Apr;26(4):1387-99.
42. Carpenter G, Pozzi A. Cell responses to growth factors: the role of receptor tyrosine kinase intracellular domain fragments. *Science signaling* 2012 Sep 25;5(243):pe42.
43. Matteucci E, Bendinelli P, Desiderio MA. Nuclear localization of active HGF receptor Met in aggressive MDA-MB231 breast carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2009 Jun;30(6):937-45.
44. 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(5):995-1004.
45. Hashigasako A, Machide M, Nakamura T, Matsumoto K. Bi-directional regulation of Ser-985 phosphorylation of c-met via protein kinase C and protein phosphatase 2A involves c-Met activation and cellular responsiveness to hepatocyte growth factor. *Journal of biological chemistry*, The 2004;279(25):26445-52.

Figures:

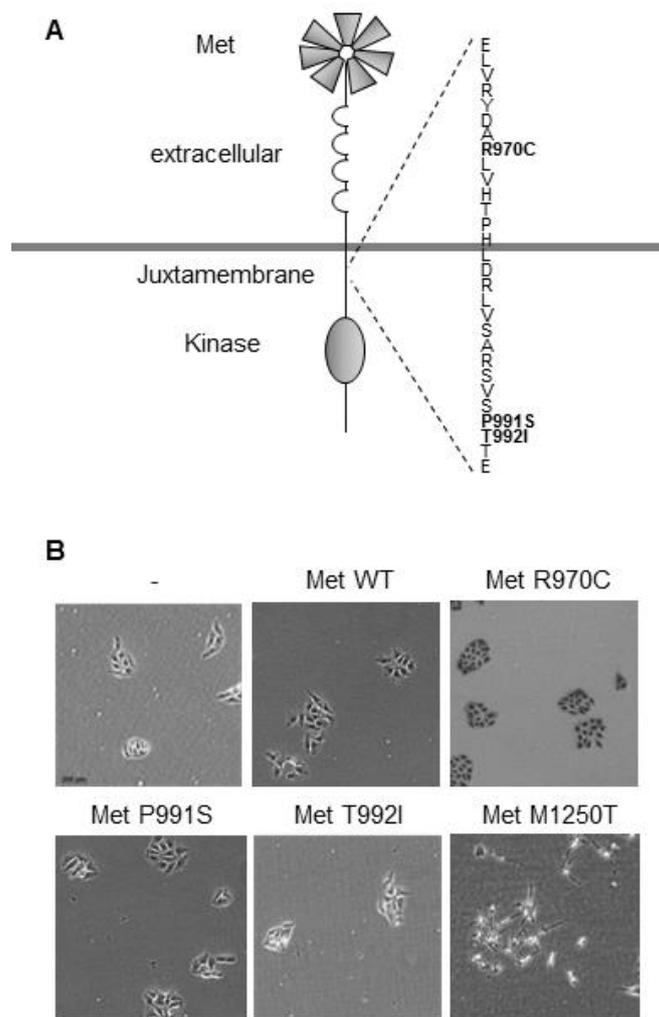


Figure 1: Scattering of MDCK cells expressing Met juxtamembrane variants

(A) Schematic representation of Met receptor with the extracellular, juxtamembrane and kinase domains and positions of the R970C, P991S, and T992I juxtamembrane mutations (B) MDCK cells stably expressing wild-type human Met (Met WT) or a variant mutated in the juxtamembrane domain (R970C, P991S, T992I) or kinase domain (M1250T) were seeded at low density. The next day cell islets were fixed and stained.

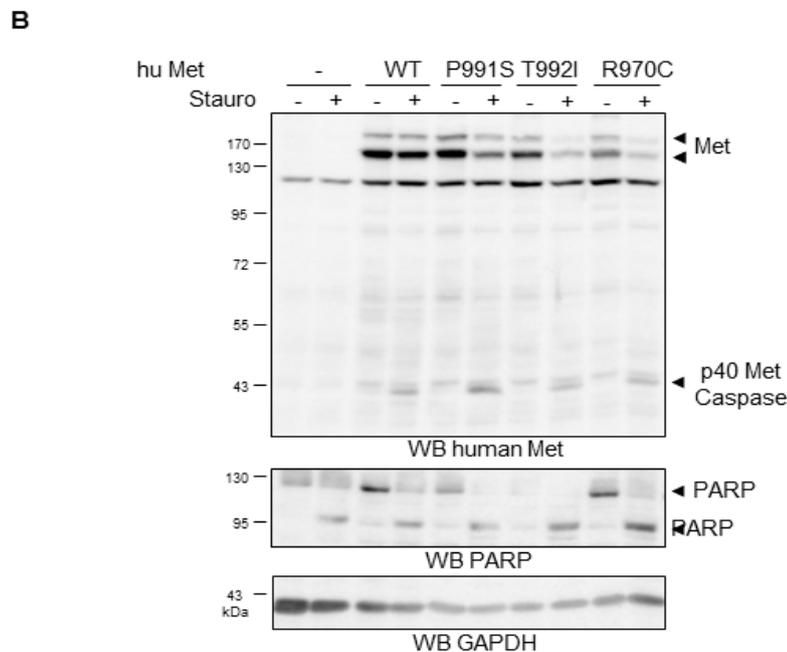
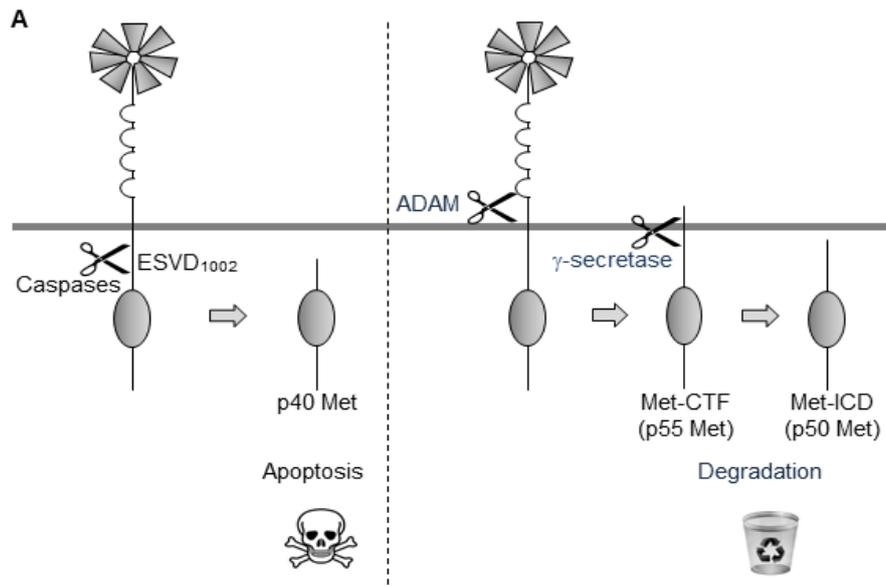


Figure 2: Effects of Met juxtamembrane mutations on caspase cleavages

(A) Schematic representation of the Met caspase cleavage leading to generation of p40 Met fragment involved in regulation of apoptosis and PS-RIP leading to generation of Met-CTF by ADAM and Met-ICD by γ -secretase. Degradation of both Met-CTF and Met-ICD are involved in regulation of the receptor half-life. (B) MDCK cells stably expressing WT, P991S, T992I, or R970C human Met (hu Met) were treated for 8 h with staurosporin (Stauro; 1 μ M). Cell lysates were analyzed by western blotting with an antibody directed against the C-terminal region of human Met, against PARP to assess caspase activation, or against GAPDH to assess loading. Arrowheads indicate full-length Met and the p40 Met caspase fragment.

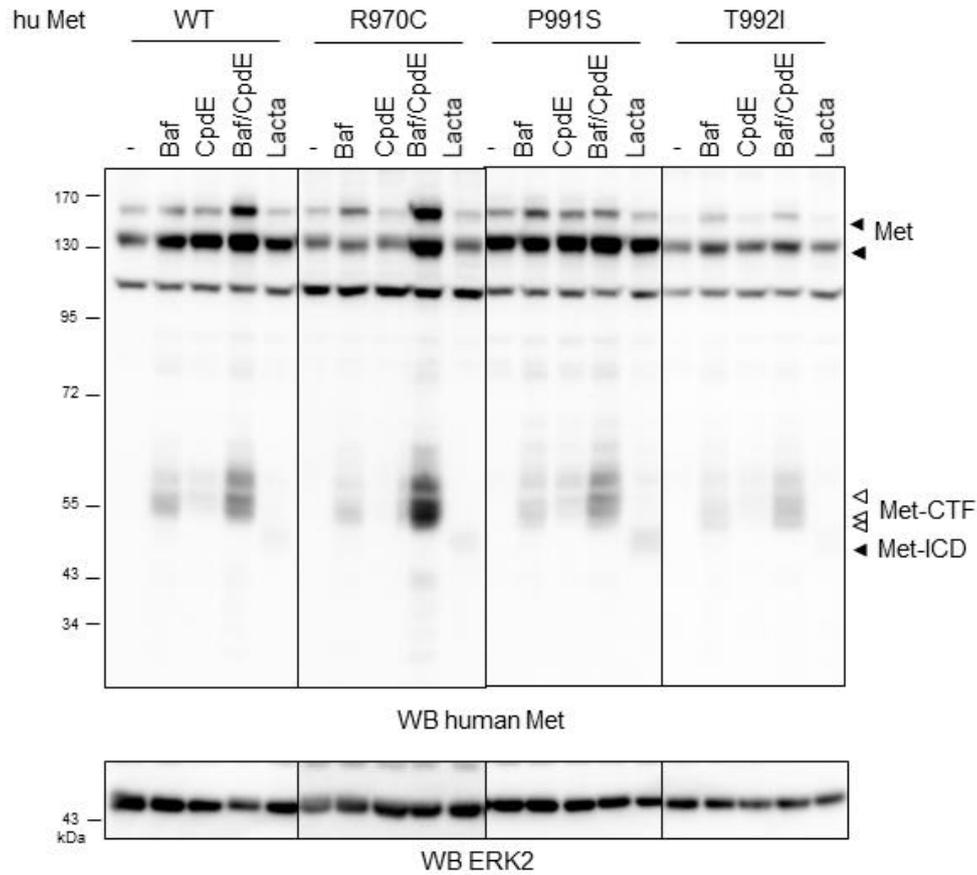


Figure 3: Effects of Met juxtamembrane mutations on secretase cleavages

MDCK cells stably expressing WT, R970C, P991S, or T992I human Met were treated for 16 h with bafilomycin A1 (Baf; 5 nM) and/or Compound E (CpdE; 1 μ M) or for 5 h with lactacystin (Lacta; 10 μ M). Cell lysates were analyzed by western blotting with an antibody directed against the C-terminal region of human Met or ERK2. Full arrowheads indicate full-length Met and the Met intracellular domain (Met-ICD). Empty arrowheads indicate the Met C-terminal fragment (Met-CTF).

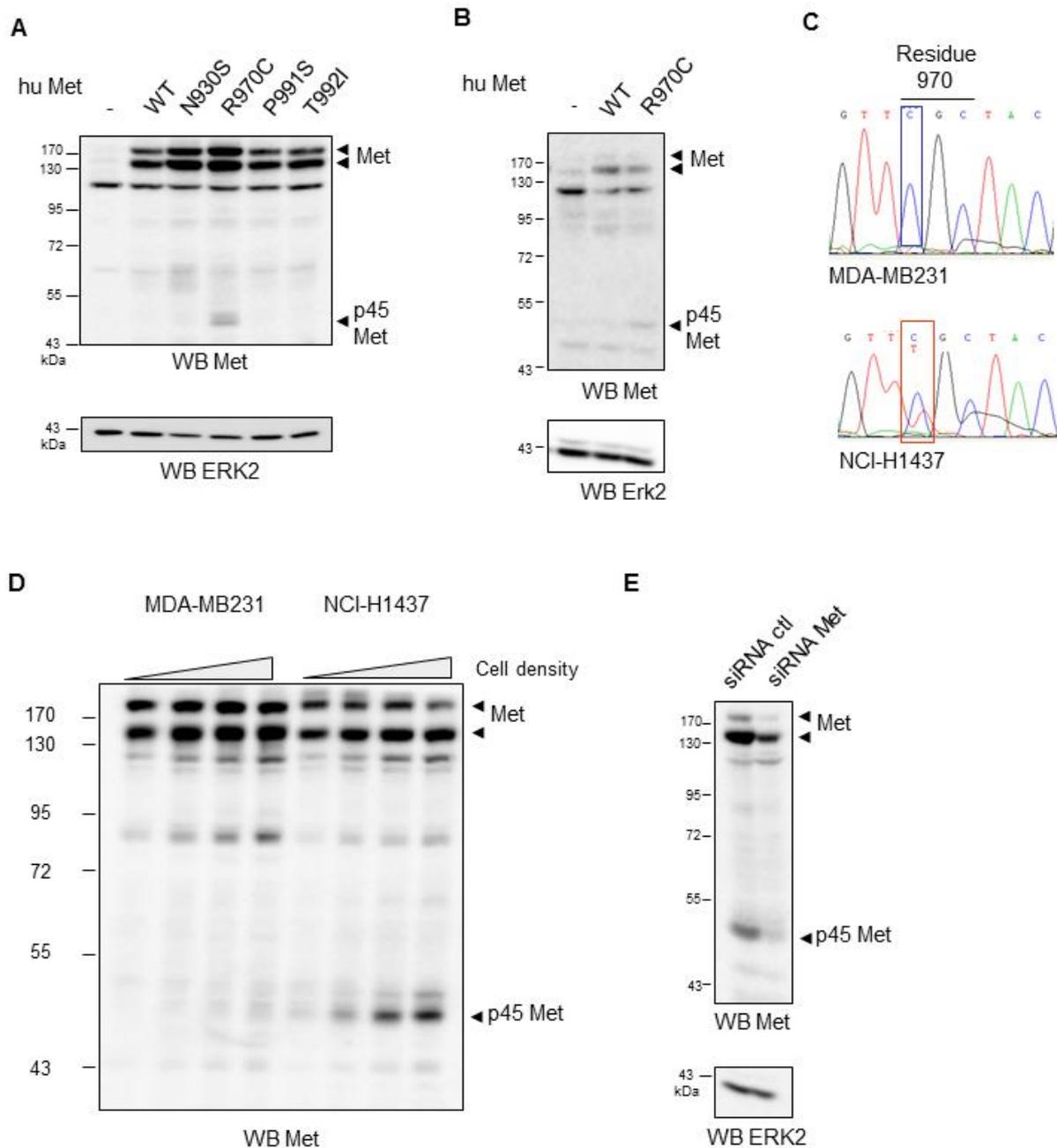


Figure 4: The R970C mutation promotes generation of a p45 Met fragment

(A) Vectors expressing WT, N930S, P991S, T992I, or R970C human Met and (B) vectors expressing WT Met or R970C Met were used to transiently transfect MDCK or MCF-7 cells, respectively. (C) Genomic DNA of MDA-MB231 and NCI-H1437 cells was extracted and sequences corresponding to the Met juxtamembrane region were amplified by PCR and sequenced. (D) MDA-MB231 and NCI-H1437 cells were seeded at 8, 4, 2, and 1 x 10⁵ cells/well in a 12-well plate and cultured for three days. (E) NCI-H1437 cells were transfected with a control siRNA (ctl) or a pool of three siRNAs targeting Met. (A,C,D,E) Cell lysates were analyzed by western blotting with an antibody directed against the C-terminal region of human Met and ERK2. Arrowheads indicate full-length Met and p45 Met.

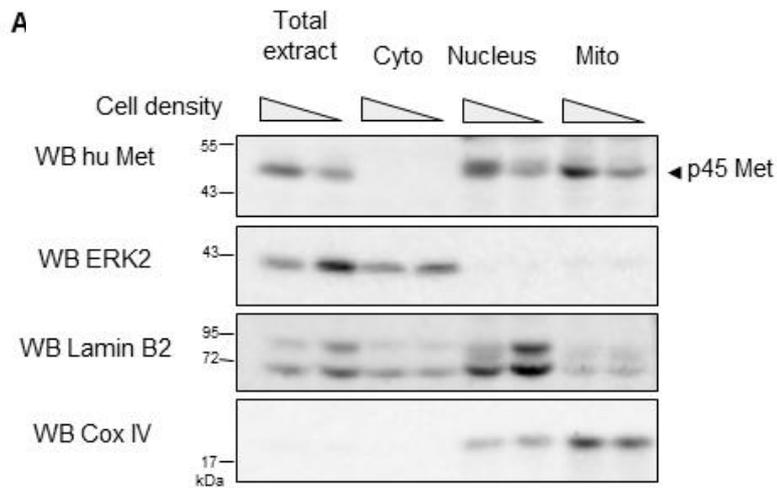


Figure 5: Subcellular localization the p45 Met fragment

NCI-H1437 cells cultured to low density (10^5 cells/well of 12 wells plate) or high density ($5 \cdot 10^5$ cells) were fractionated into nuclear, cytoplasmic (cyto), and mitochondrial (mito) fractions. Proteins from whole-cell lysates and the different fractions were analyzed by western blotting with an antibody directed against the C-terminal region, the nuclear protein lamin B2, the cytoplasmic protein ERK2, or the inner mitochondrial membrane protein Cox IV. Arrowheads indicate full-length Met and the p45 Met fragment.

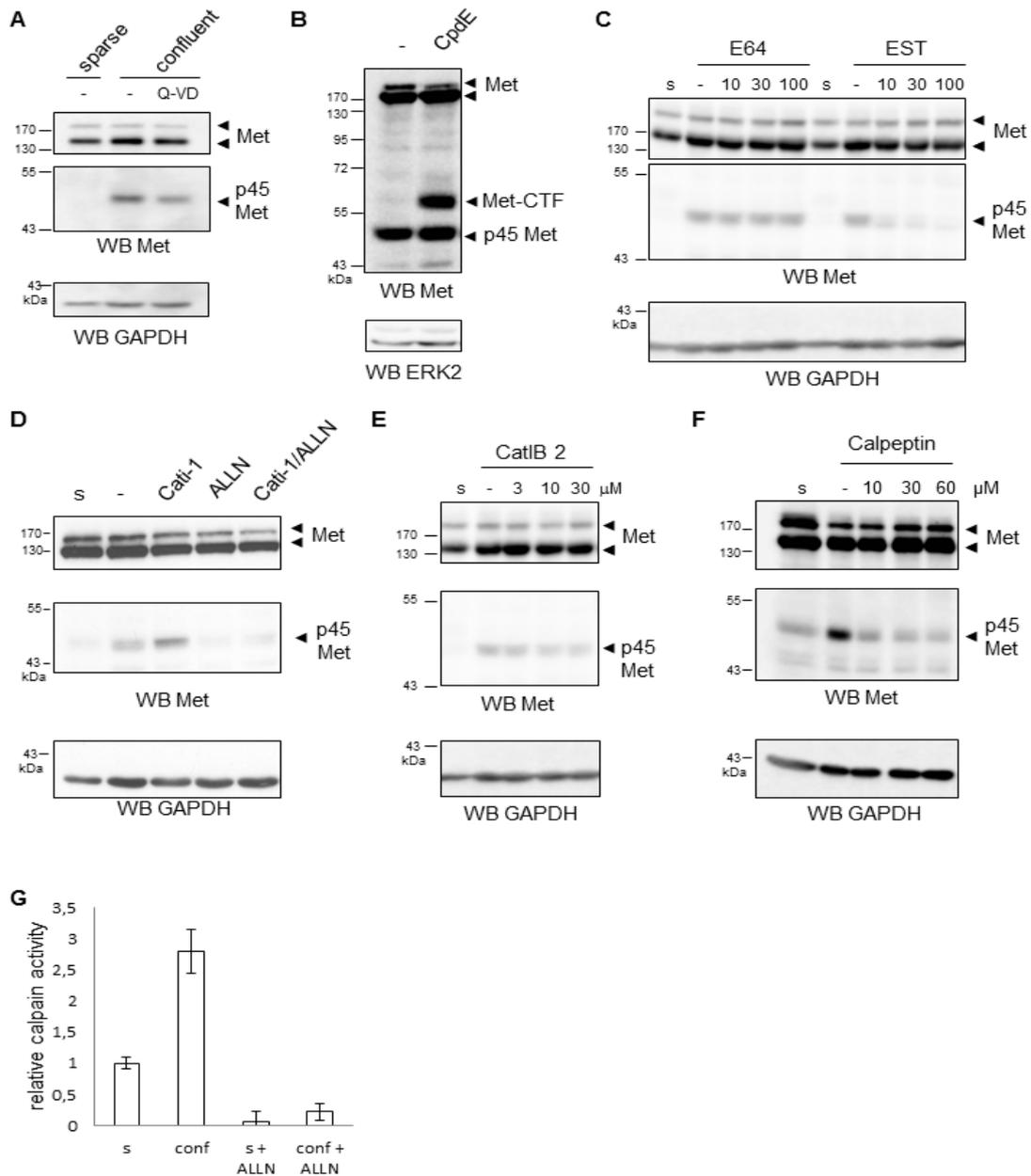


Figure 6: Involvement of proteases in p45 Met fragment generation

Sparse (s) and confluent NCI-H1437 cells were treated with various protease inhibitors: (A) 16 h with 20 μ M pan-caspase inhibitor Q-VD; (B) 16 h with 1 μ M γ -secretase inhibitor Compound E; (C) 16 h with the indicated concentration of the non-permeating cysteine protease inhibitor E64 or the cysteine protease inhibitor EST; (D) 16 h with 20 μ M cathepsin inhibitor Cati-1 or 20 μ M calpain inhibitor ALLN; (E) 16 h with the indicated concentration of the cathepsin B inhibitor CatIB2; (F) 16 h with the indicated concentration of the calpain inhibitor Calpeptin. (A,B,C,D,E,F) Cell lysates were analyzed by western blotting with an antibody directed against the human Met C-terminal region, GAPDH, or ERK2. (G) Sparse (s) and confluent (conf) NCI-H1437 were lysed and total calpain activity was measured using Suc-LLVY-AMC synthetic substrate in presence or absence of 25 μ M of calpain inhibitor ALLN (relative calpain activity to control; n=3, \pm standard deviation).

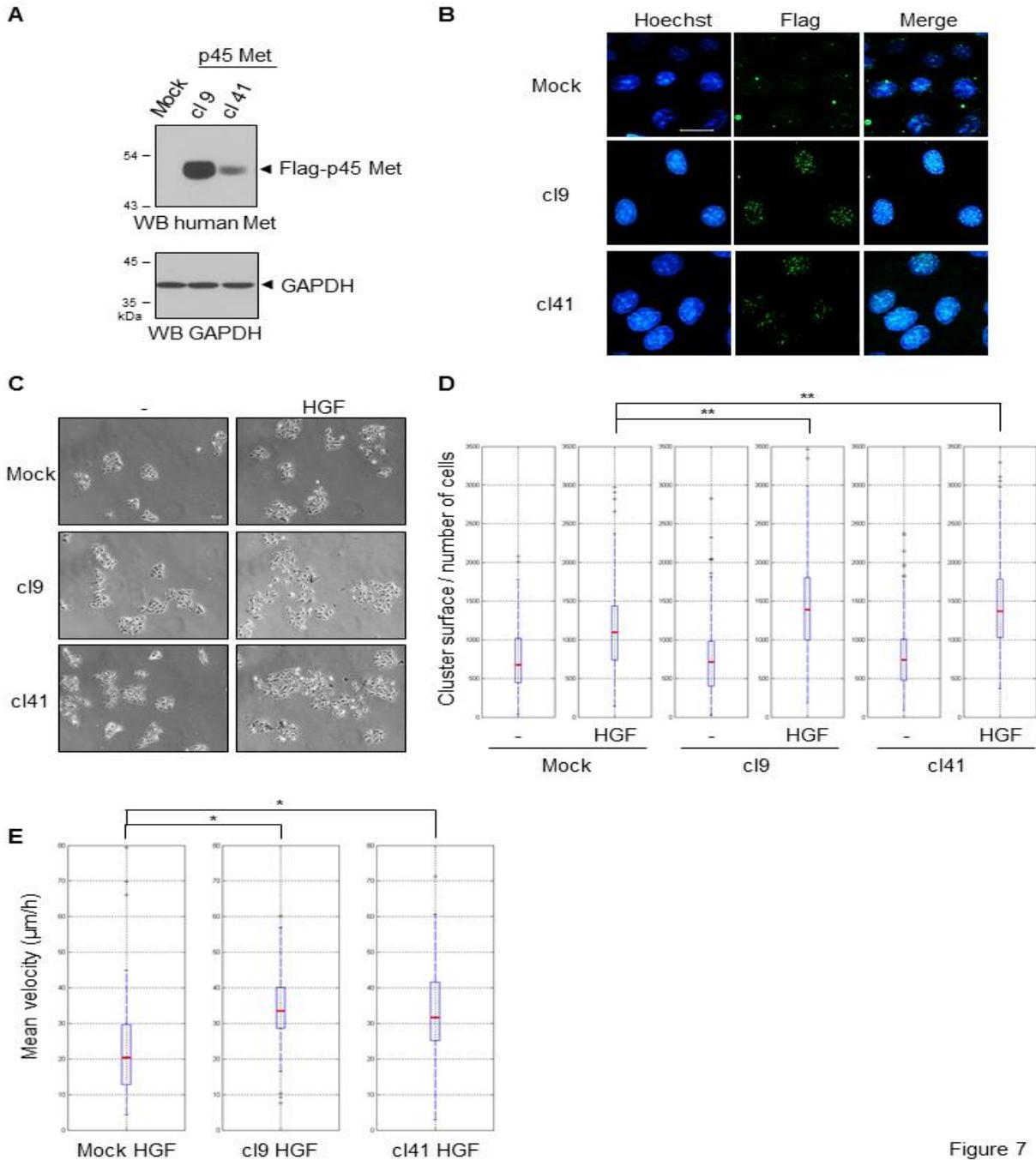
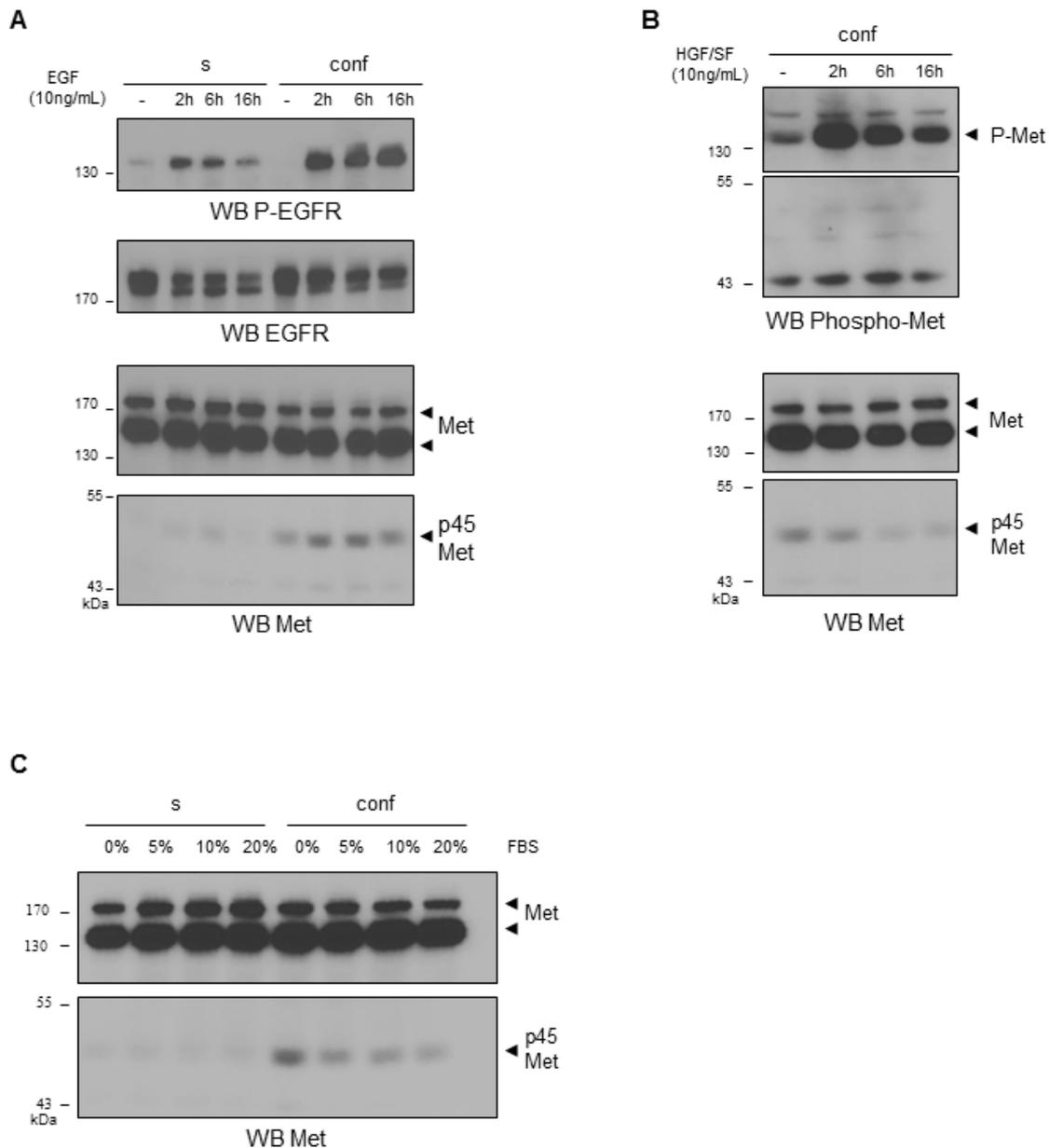


Figure 7

Figure 7: p45 Met fragment favors cell scattering

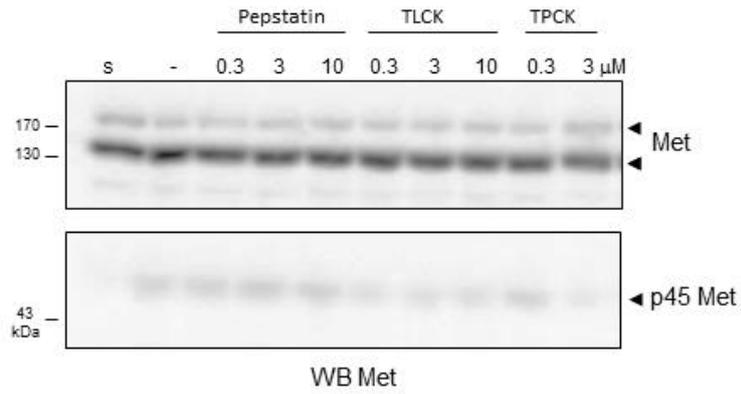
(A) Cell lysates from MDCK cells stably expressing or not the flagged Met fragment beginning at the C970 amino acid (flag-p45 Met) were analyzed by western blotting with an antibody directed against the human Met C-terminal region and GAPDH. Arrowheads indicate the p45 Met fragment and GAPDH. (B) MDCK expressing or not flag-p45 Met were fixed and their nucleus stained with Hoechst (blue staining), the Met fragment was detected with an anti-flag antibody (green staining). An overlay of the two stains is shown (merge) (scale bar=20µm). (C) and (D) MDCK stably expressing or not flag-p45 Met were seeded at low density. The next day the cells were treated 24h with 10ng/ml of HGF/SF. Cell islets were then fixed and stained (scale bar=50µm). Cell scattering was measured by dividing islets surface by the number of cells.

croscopy. Velocity of cells in µm/h was assessed. ((D) and (E): * p<0.005; ** p<0.001).



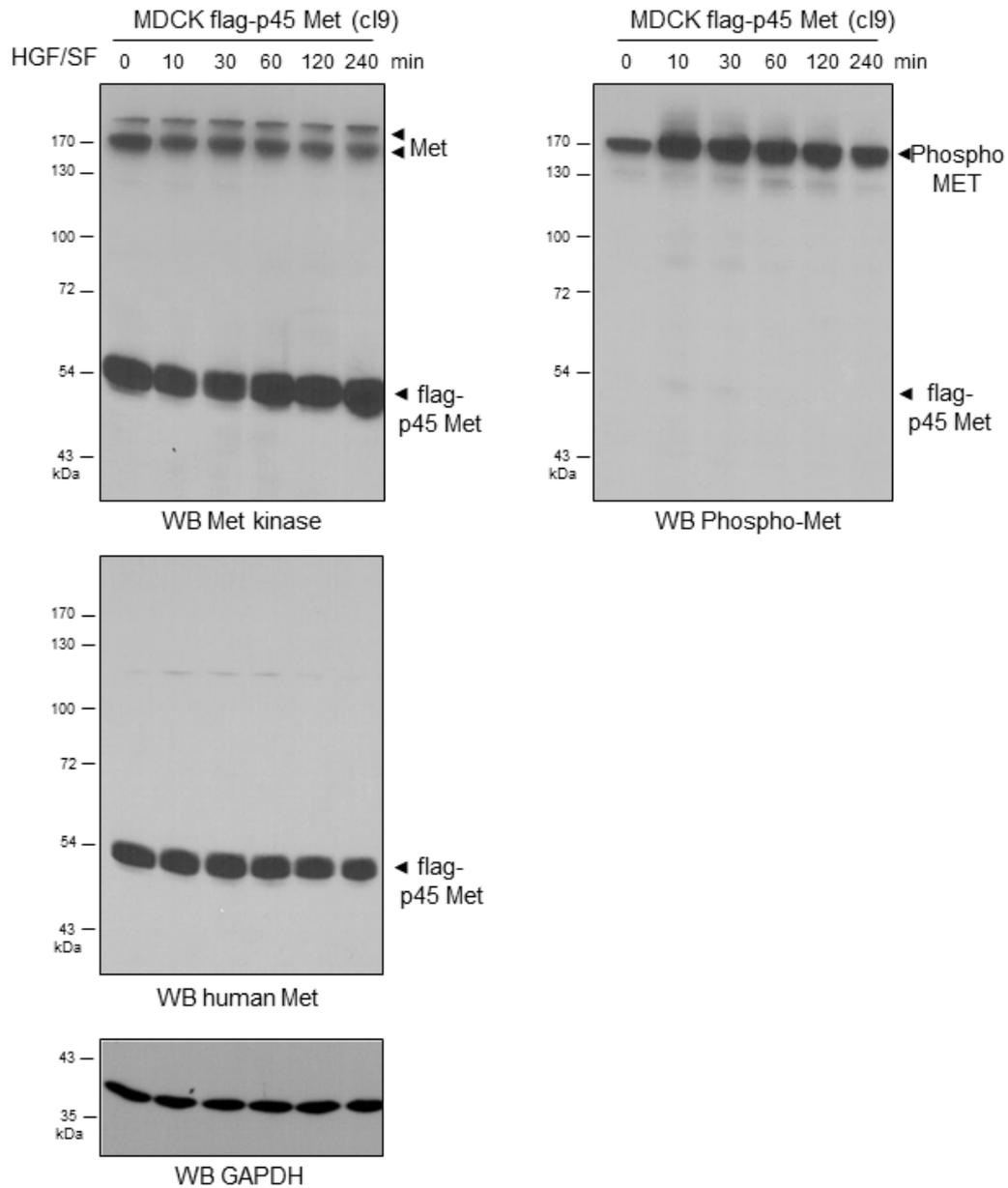
Supplementary Figure S1:

Sparse (s) and confluent (conf) NCI-H1437 cells were cultured (A) with 10ng/mL EGF for the indicated time, (B) with 10ng/mL HGF/SF for the indicated time or (C) in medium with the indicated concentration of fetal bovine serum for 16h. Cell lysates were analyzed by western blotting with an antibody directed against phosphorylated form of EGFR (P-EGFR), EGFR, the phosphorylated form of Met (P-Met) and the C-terminal region of human Met. Arrowheads indicate phosphorylated Met, full-length Met and the p45 Met fragment.



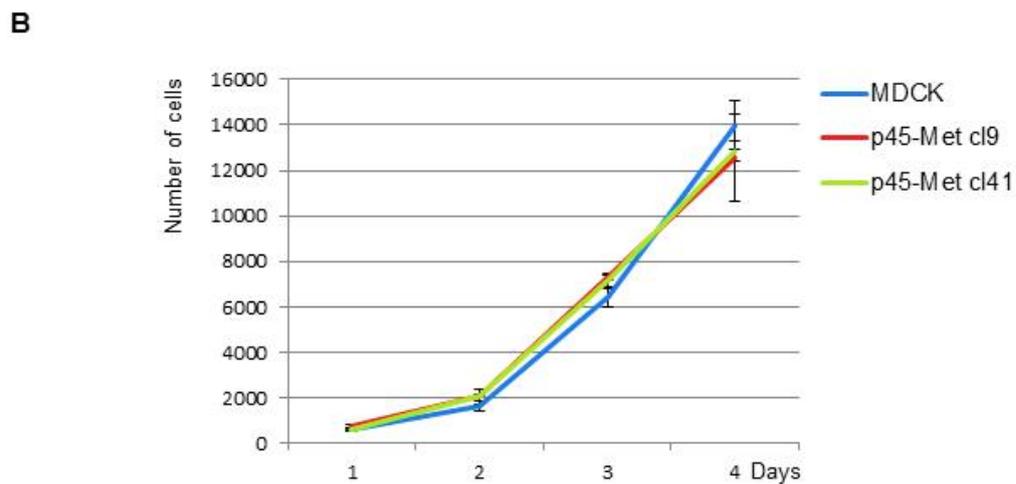
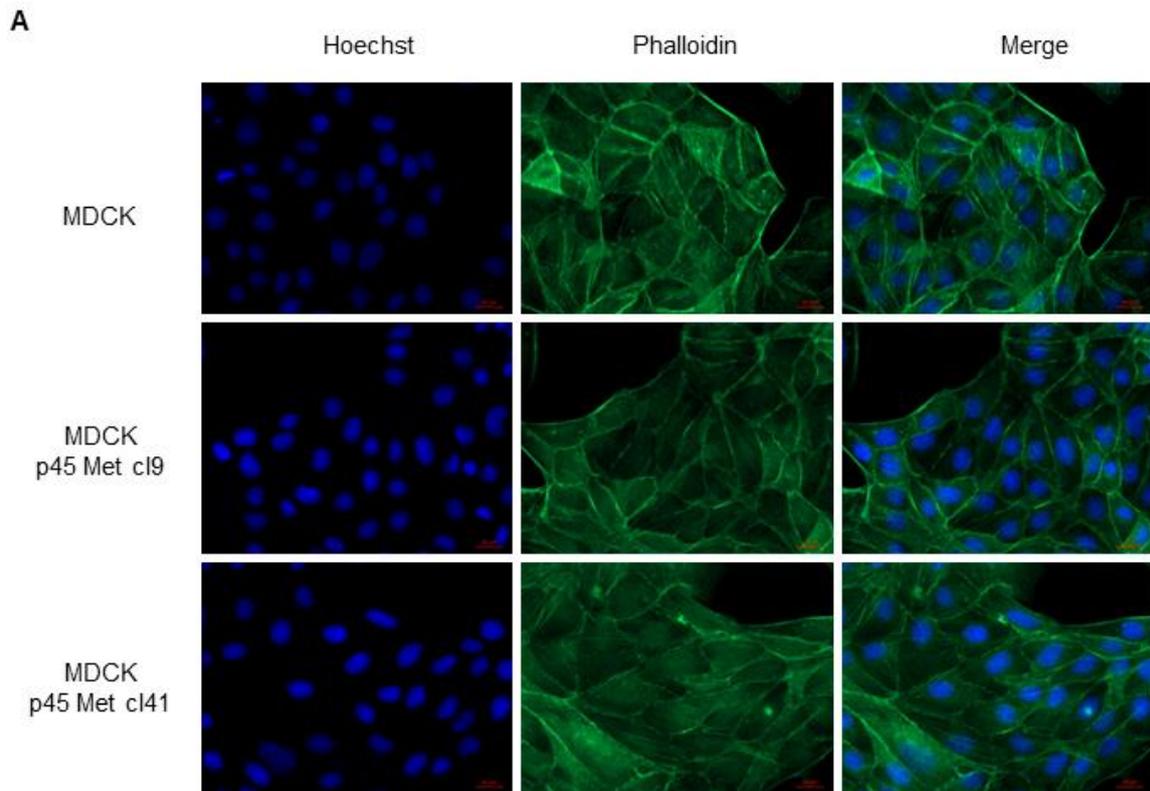
Supplementary Figure S2:

Sparse (s) and confluent NCI-H1437 cells were treated for 16h with the indicated concentration of the aspartyl protease inhibitor pepstatin, the trypsin serine protease inhibitor TLCK, or the chymotrypsin serine protease inhibitor TPCK. Cell lysates were analyzed by western blotting with an antibody directed against the C-terminal region of human Met. Arrowheads indicate full-length Met and the p45 Met fragment.



Supplementary Figure S3:

MDCK cells expressing flagged p45 Met (MDCK flag-p45 Met clone 9) were treated with 30ng/ml of HGF/SF during the indicated time. Cell lysates were analyzed by western blotting with an antibody directed against the kinase domain of Met recognizing endogenous canine Met and transfected human p45 Met. Membrane was successively reprobed with an antibody directed against the C-terminal region of human Met recognizing p45 Met, phosphorylated form of Met (Phospho-Met) and GAPDH to assess the loading. Arrowheads indicate , full-length Met, phosphorylated Met and the flag-p45 Met fragment.



Supplementary Figure S4:

(A) MDCK cells expressing flagged p45 Met (MDCK p45 Met cl9 and cl41) were fixed and stained for F-actin with phalloidin (green staining) and their nucleus stained with Hoechst (blue staining). An overlay of the two stains is shown (merge) (scale bar=20 μ m).

(B) MDCK cells expressing or not flagged p45 Met (MDCK p45 Met cl9 and cl41) were seeded at the same density. Each day, cells were counted (n=3; \pm SD).

B) Expériences complémentaires : identification d'une zone de clivage potentielle.

Nous avons initialement fait l'hypothèse que la mutation R970C créait un nouveau site de clivage, impliquant une coupure très proche de l'acide aminé 970. Cependant, une version de Met commençant au résidu C970 a un poids moléculaire apparent un peu plus élevé que le p45 Met endogène généré à partir de cellules NCI-H1437 (Figure 22A). Le clivage de Met aurait donc lieu légèrement en C-terminal de l'acide aminé R970. Dans ce cas, la mutation R970C ne créerait pas un nouveau site de clivage mais favoriserait un clivage sur un site situé en aval.

Le fragment p45 Met a un poids moléculaire apparent d'environ 2 kDa en moins que le fragment cytoMet R970, suggérant que le clivage a lieu à environ 20 acides aminés en C-terminal de l'acide aminé 970, entre les résidus L980 et E994. L'analyse de la zone comprise entre les résidus Q960 et S1000 par l'algorithme de prédiction du site SitePrediction (<http://www.dnbr.ugent.be/prx/bioit2-public/SitePrediction/>) permet d'identifier des sites de clivages potentiels au sein de cette zone, dont 4 avec une forte probabilité (Figure 22B). Deux d'entre eux se situent au niveau de la zone identifié d'après les poids moléculaires respectifs des fragments. Ces résultats devront cependant être précisés afin d'identifier le site de clivage avec précision.

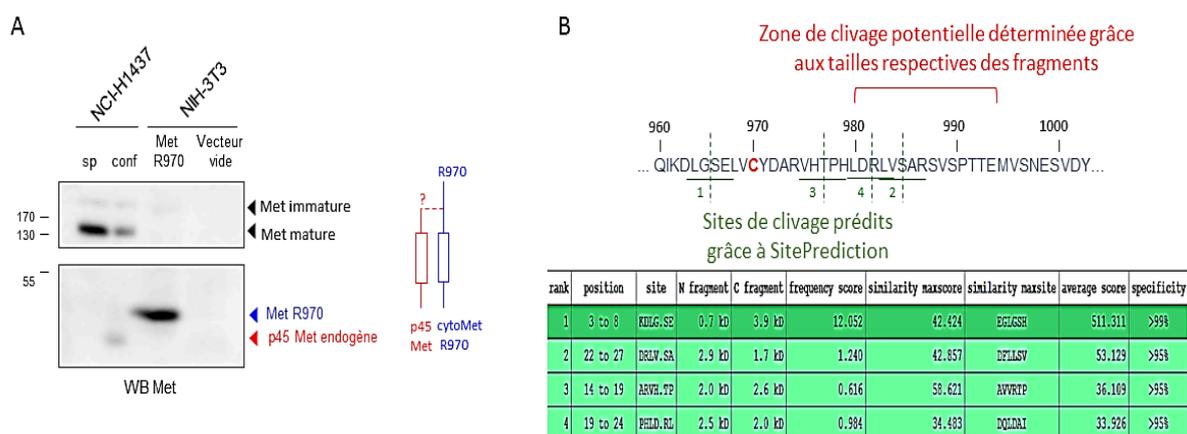


Figure 22 : Prédiction du site de clivage de Met en p45 Met par les calpaïnes

A – comparaison des poids moléculaires des fragments Met R970 et p45 Met endogène généré dans les NCI-H1437. B – Prédiction de zones de clivages potentielles en se basant sur la taille respective des fragments ou sur le site internet SitePrediction.

II. Dégradation du récepteur Met suite à un fort stress calcique

Au cours de mon étude précédente, nous avons montré par l'utilisation d'inhibiteurs de calpaïnes que la mutation R970C favorisait la génération d'un fragment de 45 kDa. Les calpaïnes étant activées par le calcium, nous avons cherché à savoir si des ionophores de calcium, comme l'ionomycine ou l'A23187 pouvaient induire ce clivage. Les ionophores ont effectivement induit un clivage très efficace de Met, cependant le fragment généré n'est pas p45 Met mais un fragment de 40kDa environ ressemblant au p40 Met caspase. Cet effet s'accompagne d'une mort cellulaire survenant en quelques heures et indépendante des caspases. Ces résultats ont été obtenus dans plusieurs lignées cellulaires, des cellules épithéliales mammaires primaires de souris ainsi que des hépatocytes primaires. La dégradation du récepteur Met suite à un traitement à l'ionomycine empêche son activation ou l'activation des voies de signalisation en aval par l'HGF/SF.

De manière intéressante, le pré-traitement des cellules à l'HGF/SF induit une protection partielle contre la mort cellulaire induite par l'ionomycine, suggérant un rôle du couple HGF/SF-Met dans la protection contre ce type de stress cellulaire.

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques m'a permis de montrer que ce nouveau fragment de Met était généré par les calpaïnes. Des siRNAs dirigés contre les calpaïnes 1 et 2 diminuent la production de ce fragment mais ne l'inhibent pas totalement, suggérant que ces deux protéases sont impliquées dans le clivage mais qu'elles ne sont sans doute pas les seules. Ainsi, le fragment a été baptisé p40 Met calpaïne. Le clivage *in vitro* de lysat cellulaire ou de Met recombinant par la calpaïne 1 purifiée génère un fragment dont la taille est similaire à celle du p40 Met calpaïne, confortant leur rôle dans la génération de ce fragment. La digestion trypsique p40 Met calpaïne purifié puis son analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier la zone au sein de laquelle le clivage calpaïne a lieu. J'ai ainsi pu identifier un site préférentiel de clivage par les calpaïnes, situé entre les résidus T1036 et le S1037. La reconstitution d'un fragment de Met débutant au S1037 montre que celui-ci possède le même poids moléculaire que le p40 Met calpaïne et confirme l'identification du site de clivage.

En raison de la similarité entre le p40 Met calpaïne et le p40 Met caspase, j'ai cherché à déterminer si le p40 Met calpaïne possède une activité cytotoxique. Dans un test de clonogénicité, la transfection de HEK293T avec du p40 Met caspase puis leur culture dans un milieu de sélection induit la mort des cellules. Les cellules transfectées avec le p40 Met calpaïne présentent un taux de survie beaucoup plus important, correspondant à environ la

moitié des cellules survivant en conditions contrôles. Ces résultats sont cependant préliminaires et restent à reproduire afin de pouvoir évaluer leur significativité. De même, j'ai pu montrer par immunofluorescence que le p40 Met caspase induit une activation de la caspase 3 tandis que ce n'est pas le cas du p40 Met calpaïne. Ainsi, contrairement au fragment p40 Met caspase, le fragment généré par les calpaines ne semble pas ou peu posséder d'activité cytotoxique ou apoptotique.

En cherchant à étudier le fragment N-terminal produit lors de la nécrose induite par stress calcique, j'ai pu montrer que celui-ci ne s'accumule pas au niveau de la membrane plasmique mais est libéré dans l'environnement extracellulaire sous la forme d'un fragment dont la taille, environ 95kDa, correspond à celle du Met-NTF, suggérant un second clivage par les métalloprotéases de la famille ADAM. Il est d'ailleurs connu que l'influx de calcium généré par les ionophores du calcium stimule l'activité des métalloprotéases membranaires. L'utilisation de l'inhibiteur pharmacologique TAPI-1 m'a permis de confirmer leur implication dans ce second clivage. En plus du Met-NTF, le clivage de Met par les métalloprotéases est connu pour induire la production d'un fragment C-terminal rapidement dégradé, le Met-CTF. Dans des conditions basales, le Met-CTF ne s'observe qu'en présence d'inhibiteurs du lysosome et/ou du complexe γ -sécrétase, qui permettent sa stabilisation. Il est cependant détecté dans les cellules traitées par l'ionomycine ou l'A23187, confirmant leur rôle activateur des métalloprotéases.

Plusieurs articles rapportent un effet de leurre au ligand de la partie extracellulaire de Met. Par exemple le domaine Sema ou une version de la partie extracellulaire de Met, « decoyMet », inhibent les réponses biologiques induites par Met (Kong-Beltran et al., 2004; Michieli et al., 2004). De même, la molécule chimérique Met-Fc, constituée de la partie extracellulaire de Met et de la région Fc des anticorps, joue inhibe la croissance de tumeurs dans des expériences de xénogreffes de lignées dépendantes de la présence d'HGF/SF (Coxon et al., 2009). J'ai donc cherché à déterminer si le Met-NTF produit lors de la nécrose induite par stress calcique possédait également des propriétés de leurre au ligand. Pour cela, j'ai tiré parti de la synthèse par notre unité du domaine K1 de l'HGF/SF, le site de liaison à haute affinité pour Met. Le domaine K1 synthétisé est biotinylé et lié à des billes de streptavidine, permettant de réaliser des expériences de capture du Met-NTF par les billes de K1-biotine-streptavidine (billes K1). Alors que la quantité de Met-NTF augmente dans le milieu suivant un traitement par l'ionomycine ou l'A23187, la quantité de Met-NTF capturé ne varie pas. Afin de confirmer que cette absence de variation n'est pas due à une saturation des billes K1, j'ai déterminé la capacité de quantités égales de Met-NTF ou de Met-Fc à inhiber l'action de l'HGF/SF sur Met. Alors que le Met-Fc inhibe la phosphorylation de Met, le Met-NTF n'a pas d'effet, suggérant qu'il ne constitue pas un leurre au ligand.

Finalement, afin de déterminer si les clivages protéolytiques du récepteur Met identifiés en laboratoire peuvent se produire *in vivo*, mon équipe a analysé par Western blot l'état du récepteur Met dans une cohorte de tumeurs pulmonaires, grâce une collaboration avec le Dr Dansin, du Centre Oscar Lambret de Lille. De manière intéressante, l'ensemble de ces fragments (Met-NTF, Met-CTF et p40 Met calpaïne) est produit dans des échantillons de tumeurs pulmonaires surexprimant le récepteur Met. Le fragment p40 Met caspase est également détecté ainsi que p45 Met précédemment identifié. Ces résultats montrent que les clivages protéolytiques mis en évidence par notre laboratoire ont lieu au moins dans des situations pathologique. L'expression des fragments corrèle avec l'expression du récepteur pleine longueur.

Publication 2: Inactivation of the pro-survival Met receptor by calpains and shedding during calcium stress induced necrosis

Rémi MONTAGNE, Mélanie BERBON, Louis DOUBLET, Nadège DEBREUCK, Anne Baranzelli, Hervé DROBECQ, Catherine LEROY, Nadira DELHEM, Eric DANSIN, Marie-Christine COPIN, Alessandro FURLAN and David TULASNE.

Inactivation of the pro-survival Met receptor by calpains and shedding during calcium stress induced necrosis

Rémi MONTAGNE¹, Mélanie BERBON¹, Louis DOUBLET^{1,2}, Nadège DEBREUCK¹, Anne Baranzelli, Hervé DROBECQ¹, Nadira DELHEM¹, Eric DANSIN², Marie-Christine COPIN^{1,3}, Alessandro FURLAN¹ and David TULASNE¹.

¹ CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille - Institut Pasteur de Lille - Université de Lille, SIRIC ONCOLille, Lille 59021, France.

2

³ Institut de Pathologie, CHR-U de Lille – Université de Lille 2, Avenue Oscar Lambret, Lille 59037, France.

Keywords: Met, Receptor tyrosine kinase, Hepatocyte growth factor/scatter factor, Proteolytic cleavages, Necrosis, Calcium, Calpain, Metalloprotease, Lung cancer, Fragment.

Running title: Met cleavage during calcium stress induced necrosis

Corresponding Author: David Tulasne, CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille - Institut Pasteur de Lille, Université de Lille, 1 Rue Pr Calmette, BP447, 59021 Lille, France

The authors declare that there are no conflicts of interest

Acknowledgments

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 "Institut National du Cancer", the "Cancéropôle Nord-Ouest" and the "Site de Recherche Intégrée sur le Cancer, SIRIC ONCOLille". We thank the Microscopy-Imaging-Cytometry Facility of the BioImaging Center Lille Nord-de-France for access to instruments and technical advice.

Abstract

Upon activation by its ligand the HGF/SF, the receptor tyrosine kinase Met promotes survival, proliferation and migration of epithelial cells. While necessary for embryogenesis, a deregulated Met signaling promotes cancer progression and metastasis. We previously showed that Met belongs to the functional family of dependence receptors which activity switches from pro-survival to pro-apoptotic during apoptosis. Indeed, the Met receptor is cleaved by caspases to generate an intracellular fragment able to amplify apoptosis. While a hallmark property of cancer cells is apoptosis resistance, some are still sensitive to other cell deaths, including necrosis induced by calcium stress. However, the role and fate of the Met receptor during this cell death is unknown.

Following treatment with calcium ionophores, cell lines and primary cells undergo necrosis and Met receptor is efficiently cleaved into an N-terminal fragment containing the ligand-binding domain and a C-terminal intracellular fragment quite similar to the caspase-generated fragment. These events are decreased by HGF/SF pretreatment, indicating that Met is a survival receptor against necrosis. We demonstrated that Met receptor degradation is achieved by a double cleavage in its extracellular part by ADAM metalloproteases and in its intracellular part by the calcium-dependant proteases calpains. These cleavages separate the Met extracellular region from kinase domain, inhibiting Met activity and its potential pro-survival response. While the intracellular fragment is very similar to the pro-apoptotic fragment generated by caspases, it does not present the same cytotoxic properties, likely due to the presence of the last few amino acid of Met which inhibits its pro-apoptotic effect. Thus, we demonstrated that Met is a regulator of necrosis able to protect cells when activated by its ligand, while it is efficiently degraded by proteolysis when this process is engaged. Interestingly, the fragments identified in this paper are observed in tumors overexpressing Met receptor along with fragments previously identified. This suggests that Met overexpression correlates with saturation of all these proteolytic degradation pathways.

Introduction

Met is a tyrosine kinase receptor expressed predominantly by epithelial cells and activated by its stromal ligand, Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF). Met activation stimulates survival, proliferation, scattering, migration, invasion and morphogenesis of epithelial cells, a biological program called invasive growth¹. Ligand-stimulated Met furthermore acts as an angiogenic factor promoting survival, migration and tubules formation by endothelial cells². Finally, Met receptor is also a neurotrophic factor in various types of neurons³. Consistent with their functions on cell cultures, HGF/SF and Met are essential in several steps of embryogenesis, since experiments conducted in transgenic mice showed they were necessary for placenta, liver, limb muscle, neurons and lung airspace formation⁴⁻⁸. In adults, HGF/SF and Met promote wound healing and regeneration of several organs like liver, kidney or thymus⁹⁻¹³.

Met is a heterodimer composed of an entirely extracellular 45-kDa α subunit and of a transmembrane 145-kDa β subunit linked by disulfide bridges. While the extracellular part of Met receptor bind HGF/SF, the intracellular part of the β subunit contains the kinase domain of the receptor¹⁴. On ligand binding and subsequent dimerization of Met, several residues in the intracellular portion become phosphorylated, allowing recruitment of cytoplasmic proteins involved in activating multiple signaling pathways like the MAPKinase pathway or the PI3Kinas/Akt pathway^{15,16}.

Aberrant Met and HGF/SF signaling is involved in promoting tumorigenesis and metastasis. A direct link between Met and cancer was evidenced by observation of Met germinal mutation linked to hereditary papillary renal carcinoma¹⁷. Since then, it was shown that Met and/or HGF/SF are overexpressed in a significant number of human cancers¹⁸. Ligand independent Met activation can also occur in cells expressing high amount of Met, for example due to its genic amplification, which leads to spontaneous dimerization and activation^{19,20}. Owing to its important oncogenic activity, a lot of therapeutic agents targeting Met receptor are currently under clinical investigation²¹.

Downregulation of the HGF/SF activated Met is an important negative regulatory mechanism preventing receptor oversignaling. Upon Met activation, the tyrosine residue 1003 is phosphorylated and recruits the E3 ubiquitin ligase c-CBL. C-CBL mediates Met ubiquitination and internalization, followed by its trafficking and degradation in the lysosomes^{22,23}. Uncoupling of Met from c-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^{24,25}.

We previously showed that Met expression and activity are also controlled by proteolytic cleavages. In basal conditions, Met is processed by PS-RIP (PreSenilin-Regulated Intramembrane Proteolysis)²⁶. Met is cleaved within its extracellular juxtamembrane domain by ADAM10 and, to a lesser extent, ADAM17²⁷. This cleavage generates a soluble Met N-terminal fragment (Met-NTF) released into the extracellular space and a membrane anchored 55-kDa fragment, Met C-terminal Fragment (Met-CTF). The latter is in turn cleaved within the intracellular juxtamembrane domain by the γ -secretase complex. The generated remnant intracellular fragment is called Met Intracellular

Domain (Met-ICD) and is degraded by the proteasome. Alternatively, the ADAM-mediated shedding can occur in endosomal compartment. In this case, the Met-NTF and Met-CTF produced are degraded by trafficking to the lysosomal compartment²⁸. Constitutive degradation of Met receptor by PS-RIP contributes to control the half-life of the receptor and to prevent its accumulation in the membrane.

Under apoptotic conditions, Met is cleaved within the intracellular juxtamembrane domain by caspases²⁹. This cleavage separates the extracellular ligand-binding domain from the intracellular kinase domain. Furthermore, the 40kDa intracellular fragment, p40-Met caspase, amplifies cell death by favoring mitochondrial permeabilization and apoptotic intrinsic pathway^{30,31}. This property makes of Met receptor a member of the dependence receptor family³².

While apoptosis has been extensively studied, necrosis has only recently been described as a regulated cell death. Necrosis is an ATP-independent cell death featuring early plasma membrane and organelle disruption. It happens in absence of caspase activation and of phosphatidylserine externalization, which are hallmarks of apoptosis³³. Many pathways can lead to cell necrosis, including calcium overload. This cell stress can be induced by an episode of ischemia-reperfusion in nervous or myocardial cells or by calcium ionophores like ionomycin in somatic cells. It triggers opening of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP), an inner mitochondrial membrane complex, which lead to swelling and disruption of mitochondria and uncoupling of oxidative phosphorylation, resulting in loss of ATP synthesis. It also induces activation of proteases like calpains or serine hydrolases³⁴⁻³⁶. In nervous cells, calpains can induce lysosomes disruption, leading to cytoplasm acidification and release of cathepsins, though this mechanism has only been identified in nervous cells, in the case of neurodegenerative disorders³⁷. Consistently, inhibition of MPTP opening or of serine hydrolases protects cells against calcium-stress induced necrosis.

While a hallmark property of cancer cells is apoptosis resistance³⁸, some are still sensitive to other cell deaths, including necrosis induced by calcium stress. However, the role and fate of the Met receptor during this cell death is unknown. Here we show that a calcium stress induced by calcium ionophores triggers a necrotic cell death and an early Met degradation. This loss of Met receptor is achieved by a double cleavage in its extracellular part by ADAM metalloproteases and in its intracellular part by the calcium-dependant proteases calpains. Interestingly, this degradation pathway seems particularly high in Met overexpressing tumours, suggesting we identified a novel way for cells to prevent Met oncogenic activity.

Materials and methods

Cytokines, drugs, and cell cultures

Ionomycin and A23187 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Staurosporin was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Purified calpain 1 was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Recombinant human HGF was purchased from Peprotech (Rocky Hill, CT, USA). The caspase inhibitor QVD-FMK, the calpain inhibitors ALLN and calpeptin, the metalloprotease inhibitor TAPI-1 and the H⁺-pump inhibitor bafilomycin A1 were purchased from Calbiochem. The cathepsin inhibitor Z-FA-FMK was purchased from Bachem (Budendorf, Switzerland). The proteasome inhibitor lactacystin was purchased from Sigma. The γ -secretase inhibitor Compound E was purchased from Alexis/Coger (Lausen, Switzerland). The calpain inhibitors ALLN and calpeptin were purchased from Calbiochem.

MDA-MB-231 and GTL-16 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen) and 1% antibiotics (10000 U/ml penicillin - 10000 μ g/ml streptomycin, Invitrogen). HEK-293T cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% Non-Essential Amino Acids (NEAA, Invitrogen) and antibiotics. MCF-10A cells were cultured in DMEM and HAM's F12 vol/vol (Invitrogen) supplemented with 5% horse serum (Invitrogen), 500 ng/ml hydrocortisone (Calbiochem), 20 ng/ml epidermal growth factor (Peprotech), 10 μ g/ml insulin (Sigma), 100 ng/ml cholera toxin (Calbiochem) and 1% antibiotics. Calcium free DMEM were purchased from Invitrogen.

Antibodies

Rabbit polyclonal antibodies directed against phosphorylated (Y1234/1235) Met (#3126), phosphorylated (S473) Akt (#9271) and active caspase 3 (#9661) and mouse monoclonal antibody directed against phosphorylated (T202/Y204) Erk1 et Erk2 were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Mouse monoclonal antibody against the kinase domain of Met (3D4) was purchased from Invitrogen. Mouse monoclonal antibody against GAPDH (6C5-32233), rabbit polyclonal antibodies against the C-terminal domain of human PARP-1 (H250), against Akt (H136) and against ERK2 (C14) and goat polyclonal antibodies against calpain-1 large subunit (C-20) and calpain-2 large subunit (C-19) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Rabbit monoclonal antibody directed against the C-terminal tail of Met (SP44) was purchased from Roche (Schlieren, Switzerland). Mouse monoclonal antibody directed against the extracellular domain of Met (MAB3582) and goat polyclonal antibody directed against the extracellular domain of Met (AF276) were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Mouse monoclonal antibody directed against the C-terminal domain of Met (DL-21) was kindly provided by Dr Sylvia Giordano (University of Torino Medical School, Italy). Mouse monoclonal antibody directed against Grb2 (81/GRB2) was purchased from BD Transduction Laboratories (San Jose, CA, 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. Rabbit polyclonal antibodies against the Flag epitopes were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Rabbit polyclonal antibody directed against tubulin (PM054) was purchase from Medical and Biological Laboratories (Nagoya, Japan).

Plasmid constructs

The vector expressing Flag-p40 Met caspase was constructed as described previously³⁰. The vector expressing p40 Met calpain (Met S1037 to S1390) was constructed as follows. The portion of Met between D1030 and S1390 was amplified by PCR using the pRS2 hu Met (kindly provided by Dr G. Vande Woude, Van Andel Research Institute, MI, USA) as a template with the following primers 5'-AGGGATCCATGGACATGTCCCCATCCTAACTAG-3' containing a BamH1 restriction site and 5'-AGCTCGAGCTATGATGTCTCCCAGAAGGAG-3' containing a Xho1 restriction site. The PCR product was subcloned into pcDNA3 between the BamH1 and Xho1 restriction sites. The amino acids D1030 to S1037 were removed with the QuickChange site-directed mutagenesis system of Stratagene, using the following primers : 5'-GTACCGAGCTCGGATCCATGAGTGGGGACTCTGATATATC-3' and 5'-GATATATCAGAGTCCCCACTCATGGATCCGAGCTCGGTAC-3'. The vector expressing Flag-p40 Met calpain was constructed as follows. pcDNA3 p40 Met calpain was subcloned into pcDNA3 FLAG between the BamH1 and Xho1 restriction sites.

Transfections and RNA interference

Transfections of HEK293T and MCF-10A cells with the reagents polyethylenamine (PEI) Exgen 500 (Euromedex), and Jet Prime (Polyplus Transfection, Illkirch, FRANCE) were performed as previously described^{30,31}. For gene silencing, cells were harvested, 400,000 cells were incubated with a mix of 3µL/mL Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and 60nM siRNA. The siRNAs were 3 nM of a pool of three stealth siRNAs (Invitrogen) targeting Met [5'-CCAUUUCAACUGAGUUUGCUGUUA-3', 5'-UCCAGAAGAUCAGUUUCCUAAUUCA-3', 5'-CCGAGGGAAUCAUCAUGAAAGAUUU-3'], 30nM of a pool of two siRNAs (Sigma Aldrich) targeting calpain1 [5'-CUAUUGGCUUCGCGGUCUA(dt)(dt)-3', 5'-GGAACAACGUGGACCCAUA(dt)(dt)-3'] or calpain2 [5'-CGCUAUUCAAGAUUUUAA(dt)(dt)-3', 5'-GAAACUGAUCCGCAUCCGA(dt)(dt)-3'] or a mix of 30 nM siRNAs targeting calpain 1 and 30nM siRNAs targeting calpain 2. Each mix was adjusted at 60nM with respective control siRNA. The cells were then plated in a 6-well plate in complete medium.

Western blotting

Western blotting was performed as previously described (30).

Immunofluorescence staining

Cells were grown on glass coverslips for 24 h then washed, fixed in PFA 4% at room temperature for 10 min and permeabilized in PBS 1X 0,5% Triton-X100 at room temperature for 10 minutes. The cells were washed and blocked in PBS 0.2% casein for 30 min. Primary antibodies were incubated for 1 h at room temperature. Antibodies were incubated alone (mouse anti-extracellular Met antibody (10µg/mL) or goat anti-extracellular Met antibody (4µg/mL)) or in combination (anti-Flag antibody (1 µg/mL) and anti-active caspase 3 antibody (1:500)). The cells were washed with PBS and incubated for 60 min at room temperature with secondary antibodies diluted to 2µg/mL. Secondary antibodies were used alone (green-fluorescent Alexa Fluor 488 conjugated anti-goat IgG (H+L), far red-fluorescent Alexa Fluor 647 conjugated anti-rabbit IgG (H+L)) or in combination (green-fluorescent Alexa Fluor 488 conjugated anti-mouse IgG (H+L) and red-fluorescent Alexa Fluor 594 conjugated anti-rabbit IgG (H+L)). The cells were washed with PBS and the nuclei counterstained with Hoechst 33258. Coverslips were mounted with Glycergel mounting medium (Dako, Carpenteria, CA). Slides were observed in oil immersion with an AxioImager Z1 (Carl Zeiss), numerical aperture: ECL-PLAN NEOFLUAR 40x NA 1.3, with a monochrome Zeiss AxioCam MRm camera and Zen Blue acquisition software.

Cell death determination

Cells were trypsinized and analyzed with Tali Apoptosis Kit (Invitrogen). Briefly, cells were harvested by centrifugation, incubated with Alexa Fluor488-conjugated Annexin V and propidium iodide then staining was measured by Tali image-based cytometer (Invitrogen) to determine the amount of unstained, simple stained and double stained cells.

***In vitro* calpain cleavage and mass spectrometry**

Cells were lysed in Lysis and Reaction (LR) buffer (HEPES 100mM pH=7.4, NaCl 150mM, Triton-X100 1%). Equal amounts of cell lysate or 5ng recombinant human Met were incubated with indicated concentration of purified calpain1 and of CaCl₂ at 30°C. Reaction was stopped by adding 3X Laemmli Buffer and heating at 95°C for 4 min. Samples were analyzed by Western blotting.

For mass spectrometry, 900 ng of recombinant human Met were incubated in LR buffer with 250µM CaCl₂ and 2,5nM purified calpain 1 at 30°C for 30min. Reaction was stopped by adding 3X Laemmli Buffer and heating the sample at 95°C for 4min. After electrophoresis, polyacrylamide gel was fixed in 40% methanol, 7% acetic acid solution and stained with Coomassie blue. Stained band corresponding to Met fragment was excised from the gel, reduced, alkylated with iodoacetamide (10 mg/ml in NH₄HCO₃, 20 mM) and digested overnight with 50 ng trypsin (Promega) in 20 mM NH₄HCO₃, or 100 ng AspN endoproteinase (Pierce). The resulting peptides mixtures were eluted from the gel, desalted, and spotted on a Maldi plate with freshly dissolved α-cyano-4-

hydroxycinnamic acid (10 mg/ml in 50% CH₃CN, TFA 1/1000). Mass spectrometry was performed with a MALDI-TOF-TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonics). MS and MS/MS data were analyzed using BioTools software. Identification of peptides was performed using Mascot, <http://www.matrixscience.com/>.

Clonogenicity Assays

For the clonogenicity assay, 4.10⁵ HEK293T cells were seeded onto six-well plates. The next day, they were transfected with the indicated construction. After 24 hours, cells were split into 100mm dishes and maintained in culture medium for another 24 hours. Culture medium was then supplemented with 800 µg/ml G418 (Gibco). After 10 days, resistant clones were counted or stained with Crystal Violet.

Tumor sample preparation

Tumor samples were sliced into pieces about 1,2mm diameter and transferred into Lysing Matrix type D tubes containing ceramic beads (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) in presence of RIPA Buffer (50mM Tris-HCl pH=7.4, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 50mM NaF, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% SDS and 1% NP-40). The samples were mechanically lysed with FastPrep homogenizer (MP Biomedicals) achieving 4 cycles of 40s at 6m/s each followed by 5 min pauses on ice. Samples were then centrifuged at 20 000g for 30 min and proteins in the supernatant was quantified using the BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, USA). Equal amounts of proteins were analyzed by Western blotting.

Results

Calcium stress induced necrosis leads to Met degradation

Treatment of epithelial cells MCF-10A with the apoptosis inducer staurosporin triggered cell death with the distinctive features of apoptosis including cleavage of the caspases substrate PARP and Annexin V staining as previously shown (Fig.1A and B). Staurosporin treatment also induced degradation of full length Met and production of the pro-apoptotic Met fragment p40Met caspase. Treatment with calcium ionophore ionomycin induced cell death after a few hours without PARP cleavage or significant Annexin V externalization. Instead, cells displayed a sustained PI staining, suggesting an early plasma membrane disruption, a hallmark of necrotic cell death, constant with known necrotic cell death induced by calcium ionophores. Interestingly, ionomycin treatment also induced an early degradation of total Met and production of a Met fragment around 40kDa which a molecular weight only slightly different from p40 Met caspase (Fig. 1A). Of note, faint bands are also observed at around 55kDa, reminding the Met-CTF fragments generated through PS-RIP. Similar Met degradation and generation 40kDa fragment generation was observed in other epithelial cell lines such as breast cancer cells MDA-MB231, gastric cancer cells GTL-16 overexpressing the Met receptor (Supplementary Fig. 1A and B), mouse primary mammary cells MECs and human primary hepatocytes (Fig. 1B and Fig. 1C). To confirm involvement of calcium stress induced cell death on Met fate, MCF-10A cells were treated with another calcium ionophore, A23187, which induce full length Met decrease and the generation the about 40 kDa fragment (Supplementary Fig 1C). Likewise, ionomycin treatment in calcium free medium failed to induce Met degradation (Supplementary Fig. 1D).

Consistently with efficient degradation of Met during calcium stress induced necrosis, HGF/SF stimulation of ionomycin pretreated cells failed to activate full length Met, and its downstream signaling pathways including MAPK and PI3K/Akt pathways (Fig. 2A). It is worth noticing that ionomycin treatment induced ERK activation, however HGF/SF is not able to induce its further stimulation in this condition. To evaluate potential survival response induced by Met against necrosis, HGF/SF pretreated cells were incubated with ionomycin. HGF/SF reduced full length Met degradation and the 40 kDa fragment generation, concomitantly to decrease of PI staining (Fig. 2B and C). This suggests that ligand activated Met protects epithelial cells against calcium stress induced necrosis.

Calpains achieve intracellular Met cleavage during necrosis

To evaluate whether the 40 kDa fragment induced by calcium stress is generated by proteolytic cleavage, we treated epithelial cells with protease inhibitor and ionomycin. Pretreatment of the cells with caspase and cathepsin inhibitors did not prevent production of the ionomycin fragment (Fig 3A). In contrast, calpain inhibitor calpeptin decreased p40 Met production in a dose-dependent manner (Fig. 3A and B). Silencing of calpain 1 and calpain 2 by siRNA decreased partially production of the

ionomycin fragment, indicating involvement of these two proteases in Met processing (Fig. 3C). However, nor calpain inhibitor or calpain 1 and 2 silencing were able to rescue full length Met detection. Activation of calpain during calcium stress was confirmed by calpain 1 autolysis, detected by generation of a cleaved form of the protease, a hallmark of its activation (Fig. 3D). Cleavage of full length Met from MCF-10A lysate by purified calpain 1 can generate a C-terminal Met fragment with the size corresponding to the calcium stress generated fragment (Fig. 4A). Similar proteolytic processing of the intracellular recombinant Met region by purified calpain 1 was also observed, with generation of a major 40 kDa fragment using 2.5nM calpain and further cleaved in smaller fragments with an excess of protease (Fig.4B). By analogy with the caspase fragment, this about 40 kDa Met fragment was called p40 Met calpain.

In the absence of consensus cleavage site for calpains, we took advantage of the *in vitro* Met cleavage. Trypsic digestion followed by mass spectrometry analysis of the p40 Met calpain peptides revealed that the first N-terminal peptide begins at the D1041 amino acid, suggesting that cleavage occurs before this sequence (Supplementary Figure 2A and B). Analysis of this region using the SitePrediction tool (www.dnbr.ugent.be/prx/bioit2-public/SitePrediction) identified a potential cleavage site between T1036 and S 1037 residues LT-S₁₀₃₇ (Fig. 4C). A version of the intracellular domain of Met starting at the S1037 amino acid was generated. Western blot analysis showed that it has the same molecular weight than endogenous p40 Met calpain, confirming that Met is likely cleaved between T1036 and S1037 amino acids (Fig. 4D). Interestingly, the mass spectrometry results showed that p40 Met calpain still owns the last amino acid of Met, whereas its caspase counterpart lacks this C-terminal tail upon caspase cleavage at the DEVD₁₃₈₀ site³⁰. A specific antibody targeting C-terminal tail of Met was able to detect full length Met and p40Met calpain but failed to detect p40Met caspase generated respectively by calcium stress induced necrosis or apoptosis (Supplementary Figure S3). Thus, calpain processing of Met preserved its C-terminal end.

In contrast to p40 Met caspase, p40 Met calpain does display very weak cytotoxic properties

We previously demonstrated that loss of the C-terminal end of Met is an important step to reshape Met intracellular domain in a pro-apoptotic factor^{30,31}. Because p40 Met calpain sequence is quite similar to p40 Met caspase but keep its C-terminal tail, we evaluated its intrinsic property to induce cell death. Thus, we tested if p40 Met calpain could have any cytotoxic effect. Immunostaining experiment show that epithelial cells transfected by p40 Met caspase displayed about 16% cleaved-caspase-3 positive cells, while p40 Met calpain displayed about 5% of positive cells, and a non-apoptotic version of p40 Met caspase carrying K1108A mutation displayed about 2% (Fig 5A). Furthermore clonogenic assay in HEK 293T cells showed that p40 Met caspase transfection dramatically decreased the number of surviving cells while p40 Met transfection induced a decrease of only a half compared to empty vector (Fig. 5B).

Calcium stress increases Met shedding which participate to its degradation

Calpain cleavage of Met at the intracellular juxtamembrane domain suggests generation of a membrane anchored N-terminal fragment. However, western blotting of cell lysate and immunostaining of MCF10A failed to show accumulation of the Met N-terminal fragment (Met-NTF) (Fig. 6A and C). In contrast, analysis of conditioned medium revealed a drastic accumulation of an about 95 kDa N-terminal Met fragment under ionomycin treatment (Fig. 6A). Similar release of Met-N-terminal fragment in the medium was observed with the GTL-16, a cell line overexpressing Met (Fig. 6B). Quantitative measure by ELISA showed about 2.5 more release of Met N-terminal fragment in conditioned medium upon calcium ionophore treatment in both cell lines, with much more higher generation of fragment in GTL16 cells consistently with overexpression of the receptor in these cells (Fig. 6A and B, lower panels). These results suggest that in addition to calpain processing, Met undergoes an extracellular cleavage releasing its N-terminal region in the medium. According to its apparent size, this N-terminal fragment could correspond to the Met-NTF, a soluble Met known to be generated by Met shedding by membrane metalloproteases of the ADAM family during the PS-RIP process.

To assess involvement of shedding in Met degradation during calcium stress, MCF10A cells were treated with TAPI, a metalloprotease inhibitor and/or calpeptin, a calpain inhibitor. Ionomycin increased generation of Met-NTF fragment which was efficiently inhibited by the metalloprotease inhibitor (Fig. 6D). Furthermore, we previously demonstrated that shedding of Met generate also a C-terminal counterpart fragment of about 55kDa (Met-CTF) anchored at the membrane. This Met CTF is efficiently degraded by the lysosome or further cleaved by gamma-secretases. Calcium stress increased detection of the Met-CTF, stabilized by lysosomal inhibitor, confirming that Met is indeed shed (Supplementary figure S4).

It is worth noticing that treatment with metalloproteases inhibitor did not decrease p40 Met calpain generation, indicating that these two proteolytic processes are independent (Fig. 6D). Furthermore metalloprotease inhibitor was able to rescue significantly full length Met expression, indicating that shedding is involved in Met degradation during calcium stress. In contrast, calpain inhibition was unable to induce such rescue (Fig 3B and 6D). However, calpain inhibition by calpeptin is incomplete since p40 Met calpain fragment generation is inhibited only partially. Taken together, these data demonstrate that Met is processed by both calpain and metalloproteases which are involved in its efficient degradation in hours upon calcium stress induced necrosis.

The shedding-generated Met N-terminal fragment lacks decoy effect for HGF/SF

Several articles report a decoy effect of different versions of the extracellular part of Met. In the case of a construct coding for the extracellular region of Met, decoy Met³⁹, or of a fusion protein of Met-NTF with the constant fraction of antibodies, Met-Fc⁴⁰. These proteins were reported to inhibit

HF/SF-induced Met phosphorylation and HGF/SF-driven cellular responses *in vitro* and tumorigenesis *in vivo*.

Since high amounts of Met-NTF are released following calcium ionophore treatment, we checked if it could act as a decoy for HGF/SF as well. We firstly performed tests of capture of medium Met-NTF by its high affinity binding domain, K1. The amount of captured Met-NTF was the same in medium from untreated cells or from ionomycin treated cells, though this medium was enriched in Met-NTF. This suggested that the Met-NTF contained in this medium could not bind HGF/SF with high affinity and was therefore unlikely to act as a decoy. To confirm this hypothesis, we compared the ability of equal amounts of Met-NTF generated by metalloprotease-shedding and of Met-Fc to inhibit Met phosphorylation following HGF/SF treatment. Met-Fc efficiently inhibited Met phosphorylation whereas Met-NTF showed no effect. Taken together these results suggest that metalloproteases generated Met-NTF during calcium stress-induced necrosis is not a decoy for HGF/SF.

Met Proteolytic processing in pulmonary tumors

Since Met receptor can be cleaved into numerous fragments (Fig. 7A), we checked the state of Met receptor in tumors of patient with non-small cell lung cancers (NSCLC) known to overexpress Met receptor in about half of the patients. We analyzed, by both immunohistochemistry and western blot, Met expression from 13 NSCLC tumors resected by surgery. Among tumor samples four displayed a score 0, two a score 1, five a score 2 and two a score 3 (Fig. 7B). Met expression in western blot experiment globally correlates with Met IHC scores (Supplementary Figure 5). In addition, several Met fragments were detected in tumors and their expression level correlated with expression level of full length Met. These fragments were detected with two different antibodies directed against intracellular region of Met indicating that they correspond indeed to Met fragments. Interestingly, the main fragments observed in tumors at about 55, 45 and 40 kDa may correspond to the ones identified in previous and present studies. To assess this, three tumors samples expressing high level of Met were co-migrated with cell extract in which the known proteolytic fragment of Met were stabilized or generated by specific culture condition. Met-CTF was stabilized by treatment with gamma-secretase and lysosome inhibitors, p45 Met was generated in highly confluent cells (manuscript in revision), and p40 Met caspase and p40 calpain were generated upon apoptosis or necrosis induction respectively (Fig. 7C). The apparent molecular size of these four fragments fitted perfectly with the This result suggests that proteolytic degradation of Met receptor happens at least in pathological conditions and is drastically increased in lung cancers overexpressing Met. In fact, saturation of these different degradation pathways could be necessary for Met overexpression.

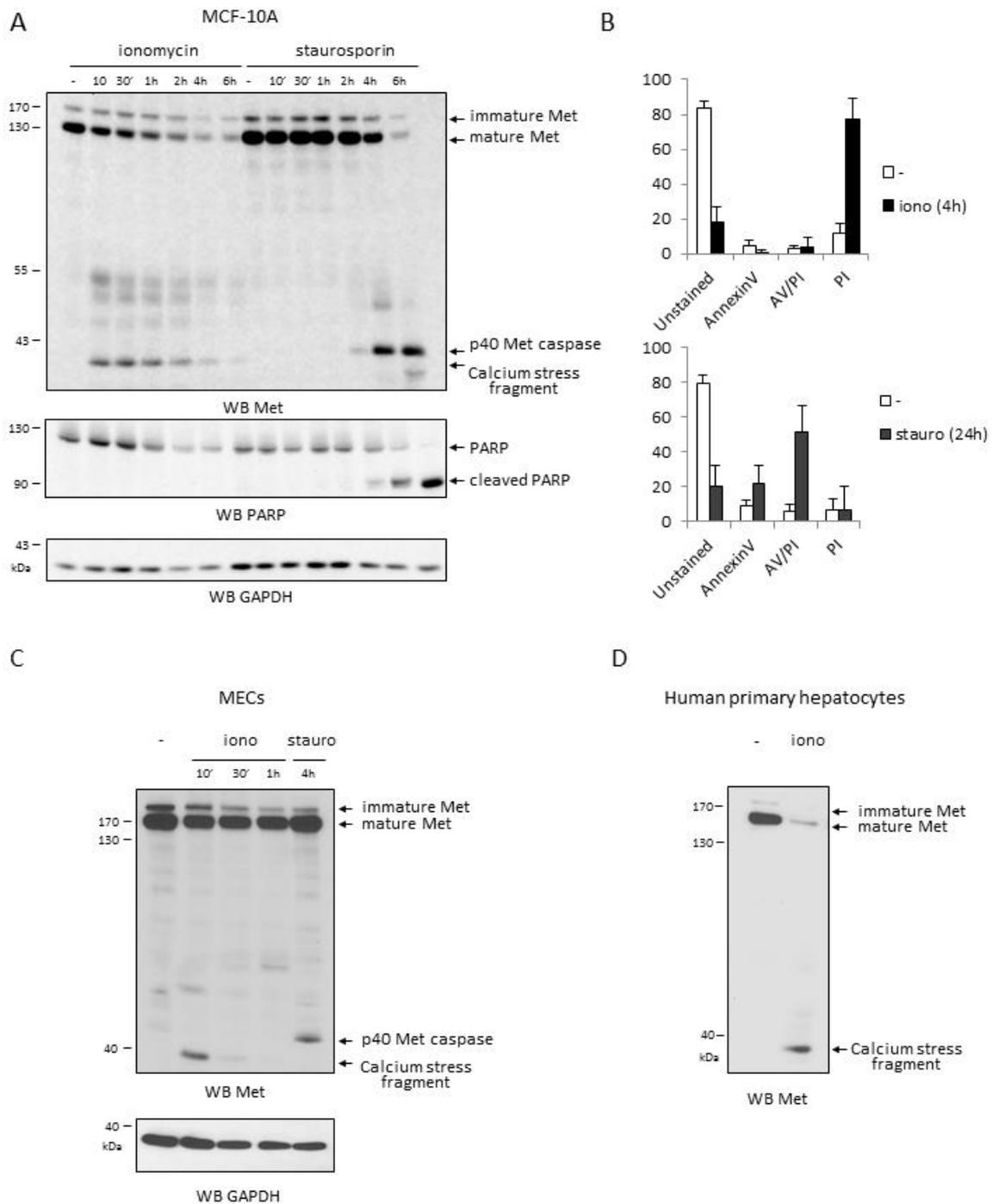


Figure 1: Ionomycin induces necrotic cell death and generation of a 40 kDa Met fragment

(A) MCF-10A cells were grown for 24 h, serum starved overnight then treated with 1 μ M ionomycin (iono) or 1 μ M staurosporin (stauro) for the indicated time. (B) MCF-10A cells were treated with 1 μ M ionomycin or 1 μ M staurosporin then stained with Annexin V-FITC and propidium iodide and assessed with Tali cytometer. Mouse MECs (C) or human primary hepatocytes (D) were treated with 1 μ M ionomycin or 1 μ M staurosporin for the indicated time then analyzed by Western blotting.

(A, C, D) Cell lysates were analyzed by western blotting with an antibody directed against the kinase domain of human Met, against PARP to assess caspase activation, or against GAPDH to assess loading. Arrows indicate full-length Met and the p40 Met caspase fragment and calcium stress induce fragment.

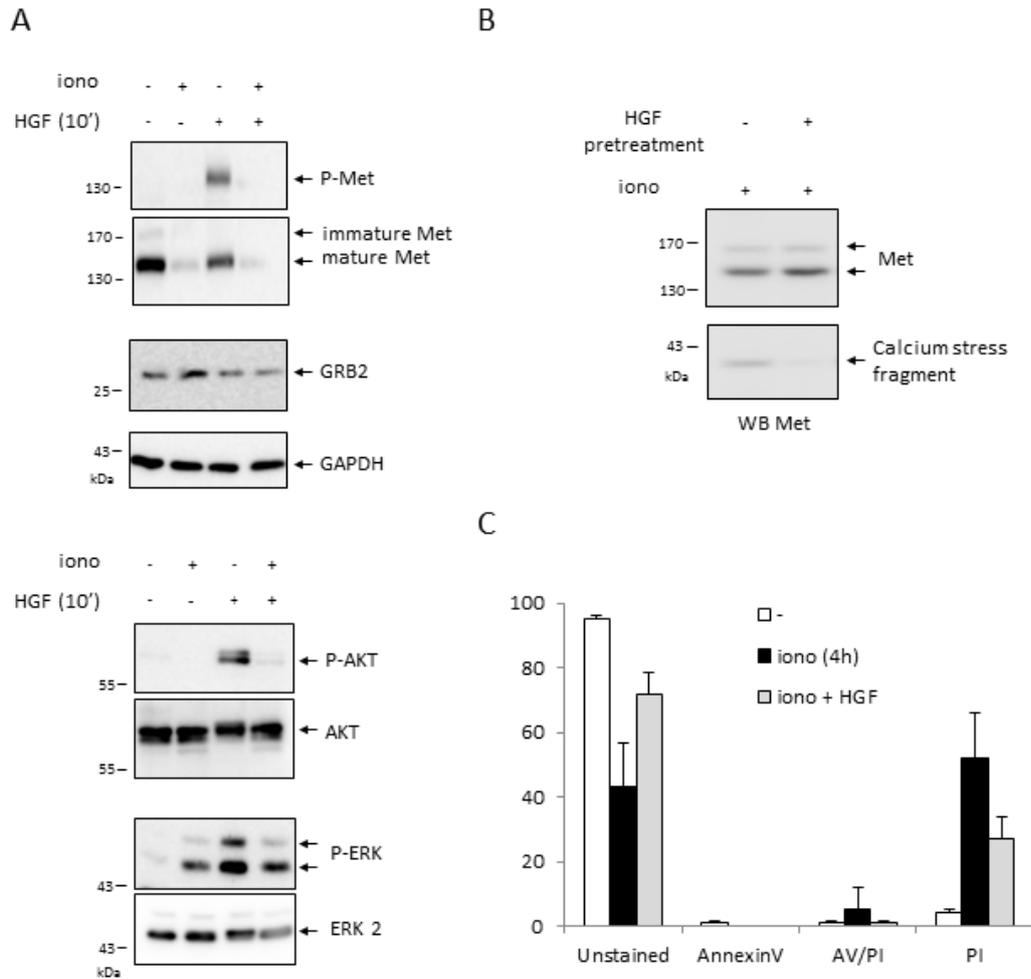


Figure 2: Calcium stress induced Met degradation impairs its survival signaling

(A) MCF-10A cells were grown for 24h, serum starved overnight then treated xh with 1 μ M ionomycin and stimulated or not 10 min with 10ng/mL HGF/SF. (B, C) MCF-10A cells were grown for 24h, serum starved overnight in presence of vehicle or 10ng/mL HGF/SF then treated 1h with 1 μ M ionomycin and (B) analyzed by Western blotting or (C) by Tali cytometer. (A, C, D) Cell lysates were analyzed by western blotting with an antibody directed against the kinase domain of human Met,, AKT, ERK and their phosphorylated forms (P-Met, P-AKT and P-ERK), against GRB2 or against GAPDH to assess loading. Arrows indicate position of the respective detected proteins.

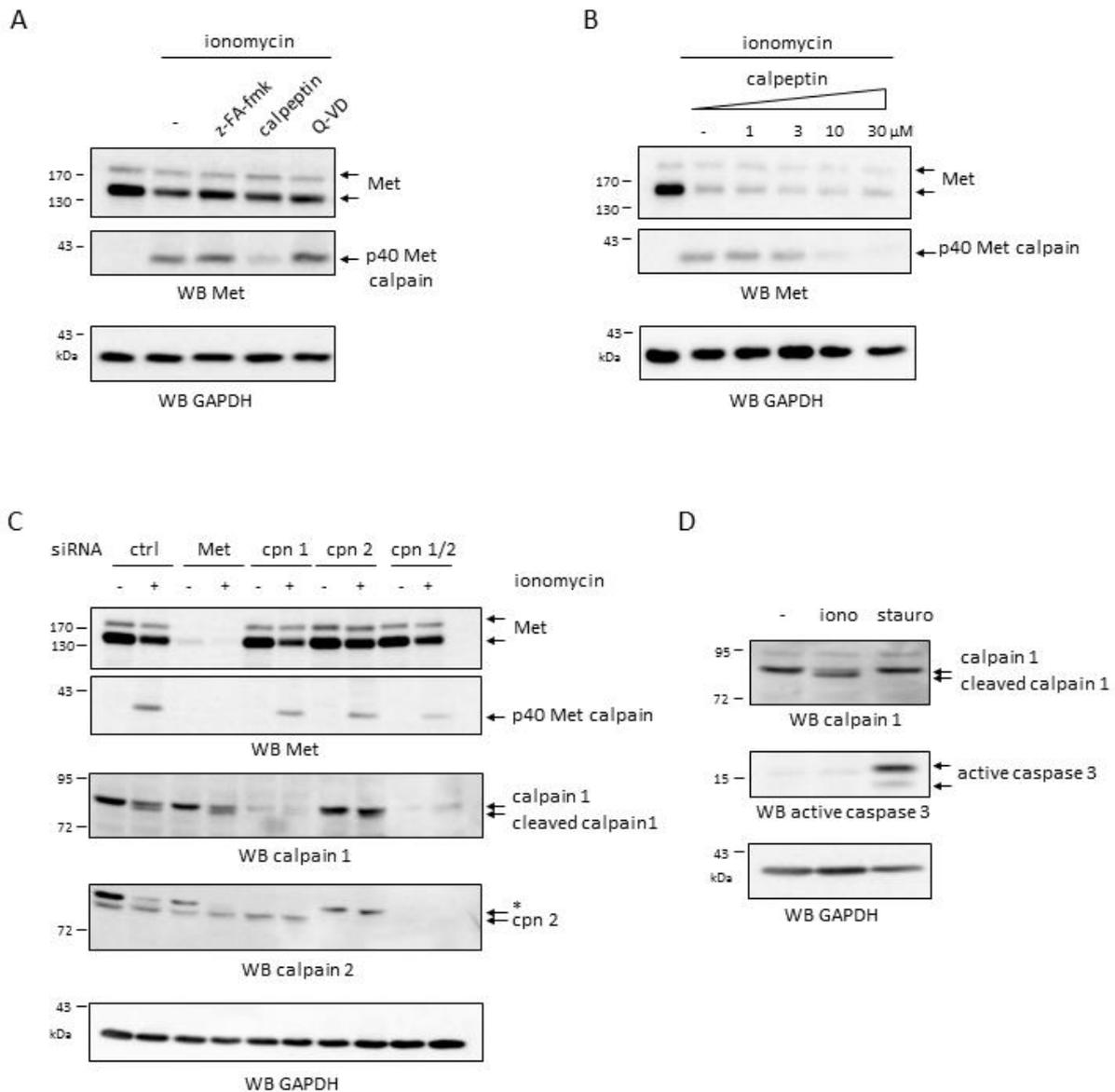


Figure 3: Ionomycin induces intracellular Met cleavage by calpains

MCF-10A cells were grown for 24 h, serum starved and treated with (A) 20 μ M of cathepsin inhibitor z-FA-fmk, calpain inhibitor calpeptin or pan-caspase inhibitor Q-VD or (B) increasing concentrations of calpeptin. They were then treated 1h with 1 μ M ionomycin. (C) MCF-10A were transfected with the same amount of control siRNAs, siRNAs targeting calpain 1, calpain 2 or a mix of siRNA targeting calpain 1 and calpain 2. Next day, they were serum starved overnight and treated 1h with 1 μ M ionomycin. (D) MCF-10A cells were grown for 24 h, serum starved and treated 1h with 1 μ M ionomycin or 6h with 1 μ M staurosporin. (A, B, C, D) Cell lysates were analyzed by western blotting with an antibody directed against the kinase domain of human Met, against calpain 1, calpain 2, cleaved caspase 3 or GAPDH to assess loading. Arrows indicate position of the respective detected proteins and their cleaved forms.

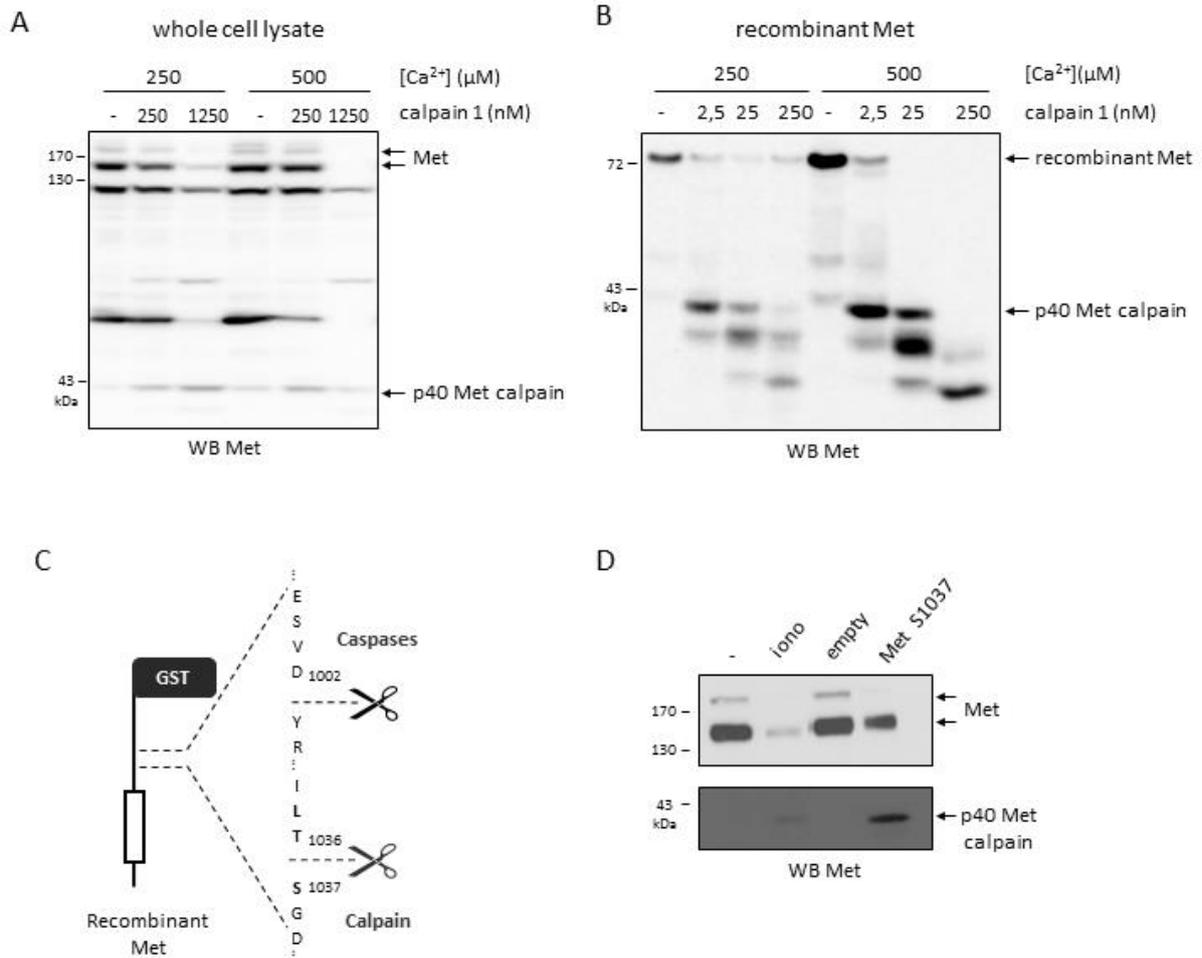


Figure 4: Characterization of the calpain cleavage site of Met

Equal amounts of MCF-10A cells extracts lysed in calpain activation buffer or **(B)** 5ng of purified intracellular recombinant Met were incubated with the indicated concentration of CaCl₂ and purified calpain 1 for 30min. **(C)** Schematic representation of the caspase cleavage site and calpain cleavage site in the juxtamembrane domain of Met. **(D)** MCF-10A cells were grown for 24 h and either serum starved and treated 1h with 1μM ionomycin or transfected with vector expressing Met S1037 construct. **(A, B, D)** Cell lysates were analyzed by western blotting with an antibody directed against the kinase domain of human Met. Arrows indicate position of Met, recombinant Met or the p40 Met calpain fragment.

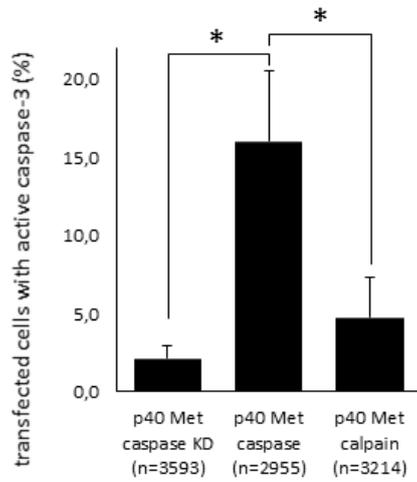
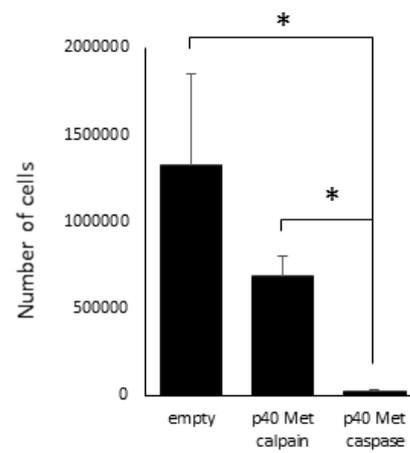
A**B**

Figure 5: Comparison of apoptotic properties of p40 Met caspase and p40 Met calpain

(A) MCF-10A cells were cultivated on glass coverslips and transfected with empty vector or vector expressing flagged versions of p40 Met caspase, p40 Met caspase K1108A or p40 Met calpain. 24 h later, cells were fixed and stained with antibodies directed against FLAG and active caspase 3. Cells were observed by fluorescence microscopy. The percentage of Flag transfected cells displaying active caspase 3 staining was determined. At least 200 cells were counted per well (n=3; \pm standard deviation). (B) HEK293T cells were transfected with empty vector or vector expressing flagged versions of p40 Met caspase, p40 Met caspase K1108A or p40 Met calpain. cells were distributed into 10mm dishes, cultivated 15 days in presence of selection agent G418 and counted. * : p<0,05.

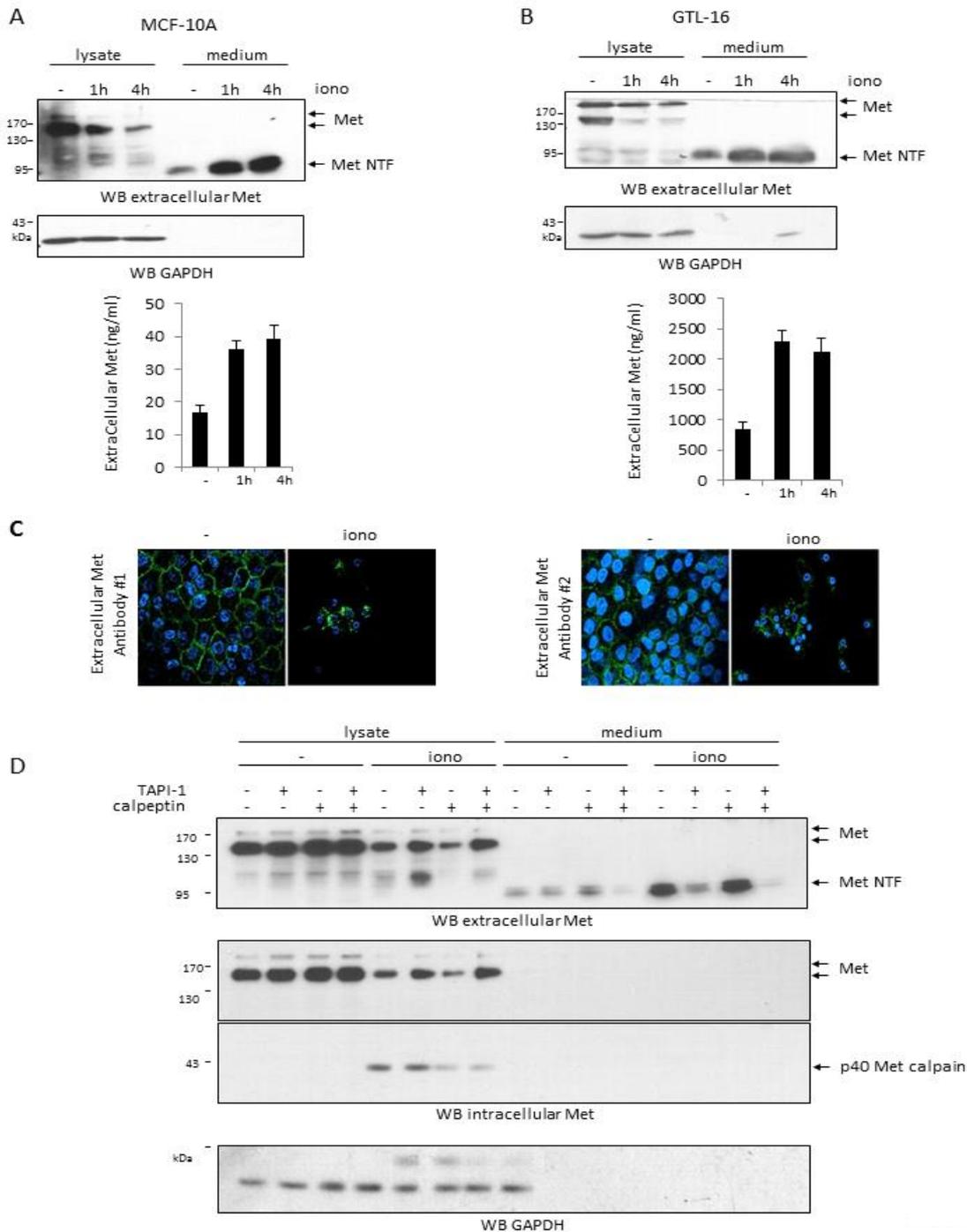


Figure 6: Ionomycin increases Met shedding at plasma membrane

(A) MCF-10A and (B) GTL-16 cells were grown for 24h, serum starved overnight and treated with 1 μ M ionomycin for the indicated. Both cell lysates and conditioned medium were analyzed by western blot with an antibody directed against the Met extracellular region. Conditioned medium from each cell lines were also analyzed by ELISA with antibody recognizing the Met extracellular region (n=3; \pm standard deviation). (C) MCF-10A cells were grown on glass coverslips, serum starved overnight, and treated with vehicle or 1 μ M ionomycin for 4h. Immunofluorescence was performed with two different antibodies directed against the Met extracellular region and the nuclei were detected with Hoechst. (D) MCF-10A and GTL-16 cells were grown for 24h, serum starved and pretreated overnight with TAPI-1 and/or calpeptin and treated 1h with 1 μ M ionomycin. Cell lysates and conditioned medium were analyzed by western blot with an antibody directed against the Met extracellular region, the Met kinase domain (intracellular Met) and GAPDH to assess the loading. Arrows indicate positions of full length Met, Met-NTF fragment and p40 Met calpain.

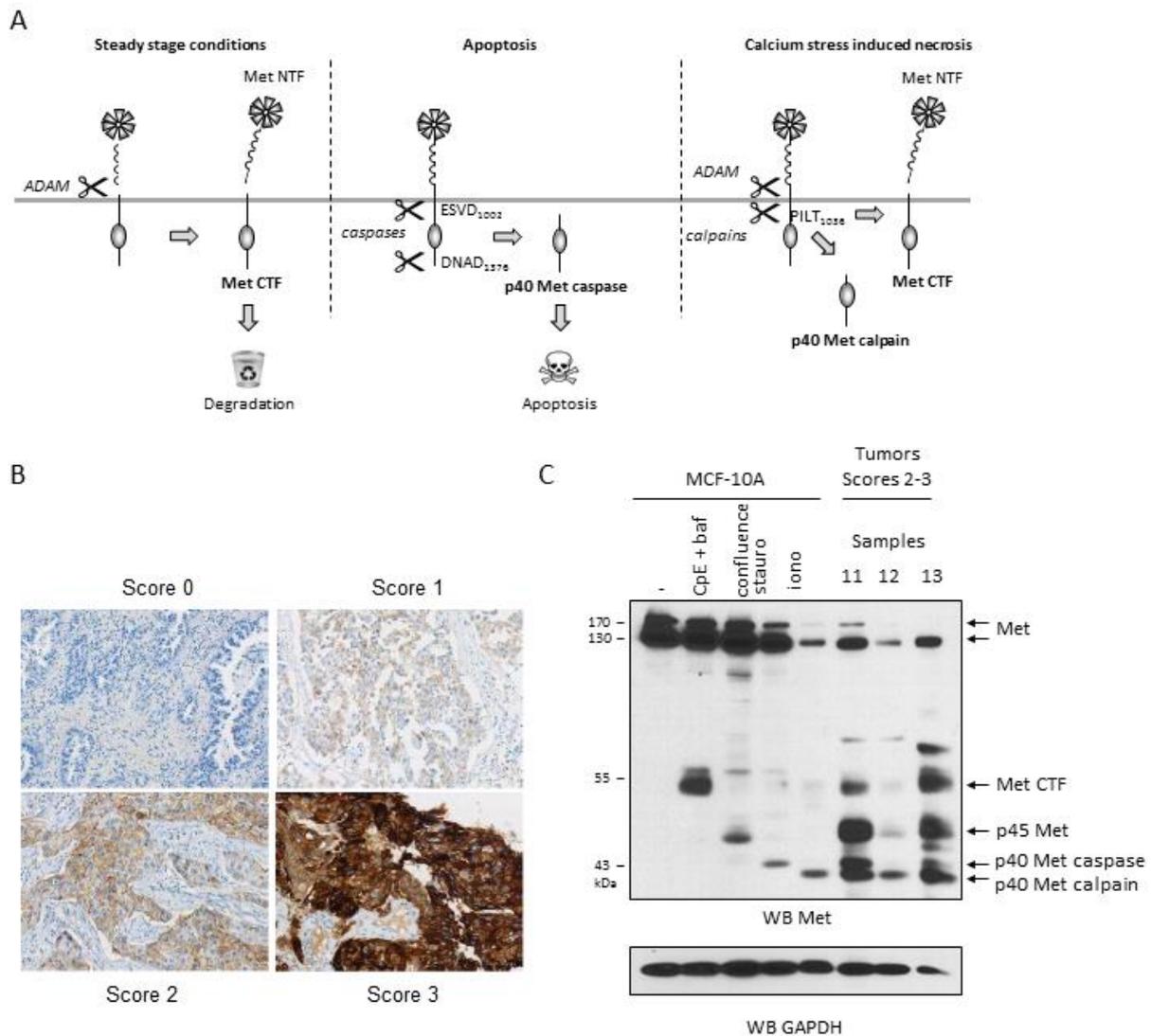
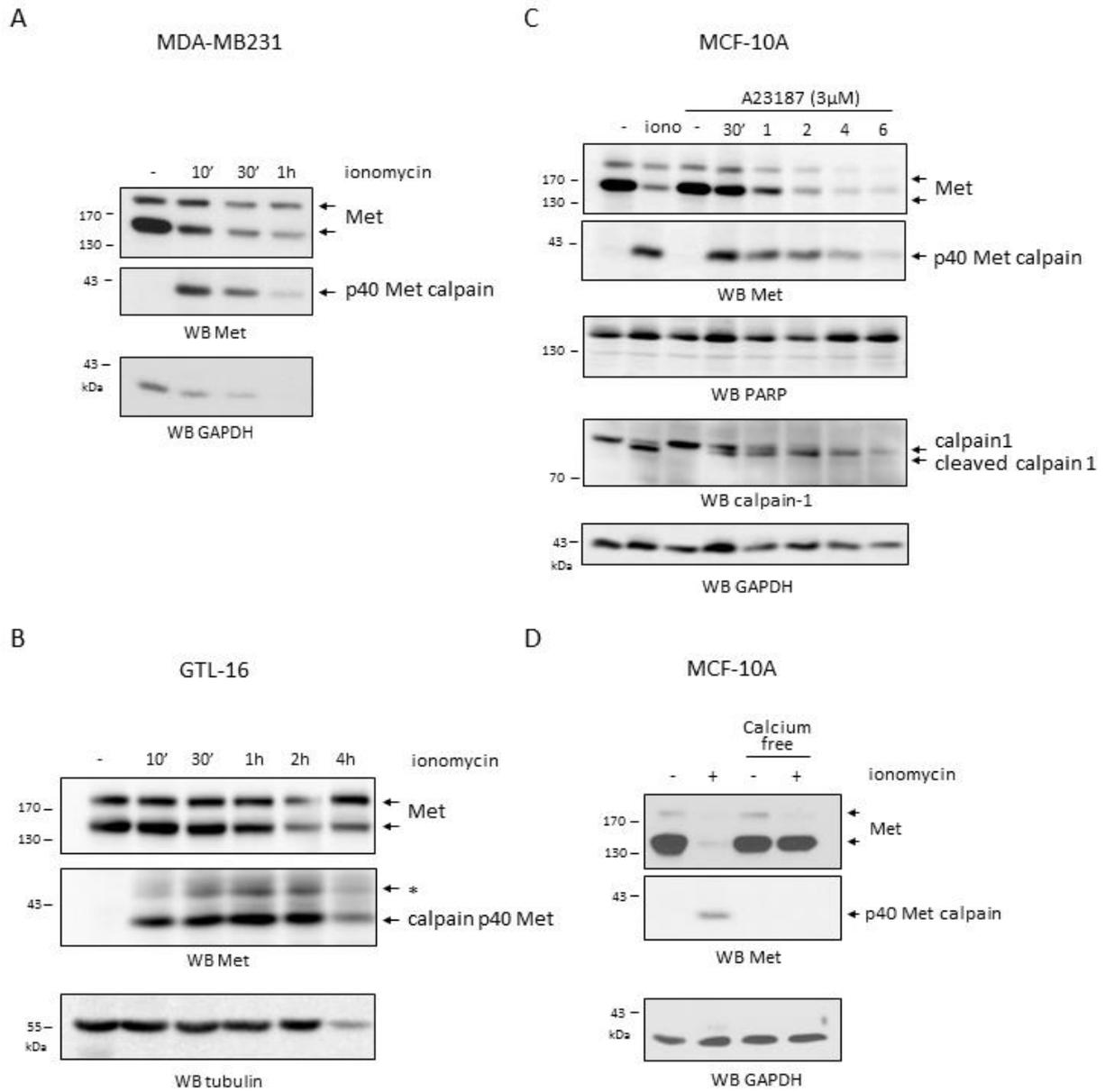


Figure 7: Met fragments are produced in non small cell lung cancer tumors overexpressing Met receptor

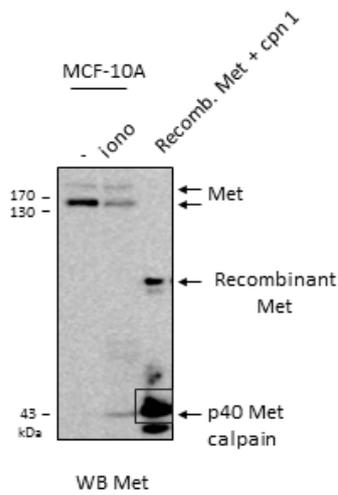
(A) Schematic representation of the different cleavages Met receptors. In basal conditions, Met is shedded by membrane metalloproteases into an N-terminal fragment (NTF) released into extracellular space and generation of a C-terminal domain (CTF). Degradation of CTF is involved in regulation of receptor half-life. In confluent cells, Met is cleaved by calpains into a fragment about 45 kDa (p45 Met) able to increase cell motility. During apoptosis, Met is cleaved by caspases into a fragment about 40 kDa, p40 Met caspase involved in amplification of apoptosis. During calcium-stress induced necrosis, Met cleaved by both the metalloproteases into the Met NTF and Met CTF and by calpains into a 40kDa fragment, p40 Met calpain. (B) Tumor samples were analyzed by IHC to determine the level of Met expression. Tumors with a score of 2 or 3 were analysed by Western blotting. As controls, MCF-10A were used following treatment with 1 μ M E compound and 5nM bafilomycin for 5 hours (CpE + baf), 1 μ M staurosporin for 6 hours (stauro), 1 μ M iono for 1 hours (iono).



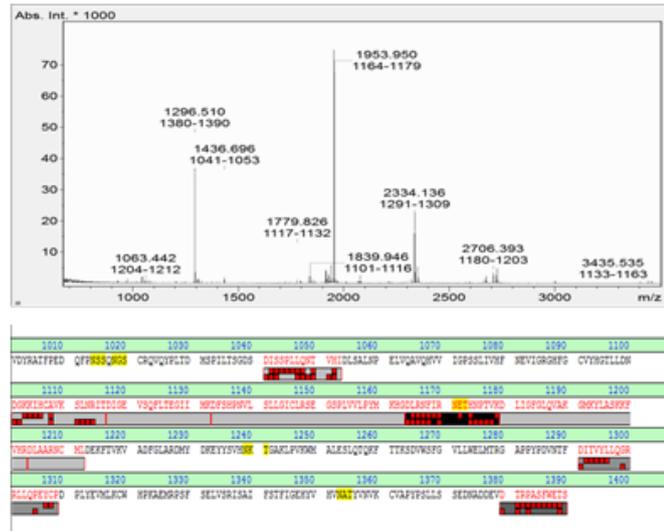
Supplementary Figure 1: Induction of Met degradation by A23187 in MCF-10A or by ionomycin in MDA-MB231 and GTL-16

(A) MDA-MB231 or (B) GTL-16 were grown for 24 hours, serum starved overnight then treated with 1 μ M ionomycin then analyzed by Western blotting. (C) and (D) MCF-10A cells were grown for 24 hours, serum starved overnight, (C) treated with 3 μ M A23187 or (D) treated with 1 μ M ionomycin after replacing starvation medium by calcium free medium, then analyzed by Western blotting.

A



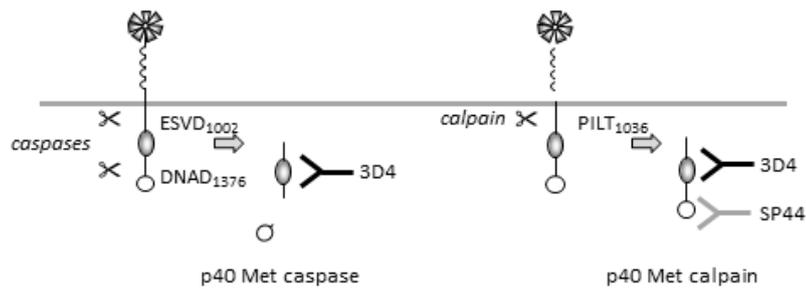
B



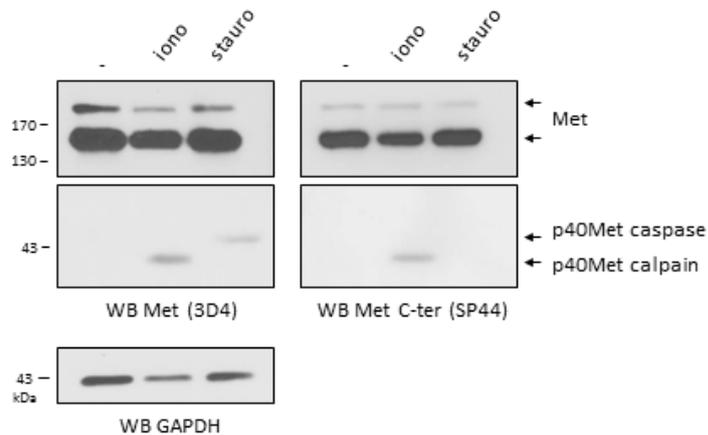
Supplementary Figure 2: identification of calpain cleavage site

(A) Purified recombinant Met (900ng) were incubated with purified calpain 1 for 30min. A small fraction of reaction product was co-migrated with MCF-10A cells treated 1h with 1 μ M ionomycin. (B) After separation of the reaction product by SDS-PAGE, the band corresponding to p40 Met calpain was analyzed by mass spectrometry. *Up*: Mass spectrum of AspN digest annotated. *Down*: Protein view, peptides matching the sequence are represented in grey bars, If MS/MS spectrum is available for the selected peptide, the red bricks inside. The grey represent measured B and Y ions matching to the peptide sequence.

A

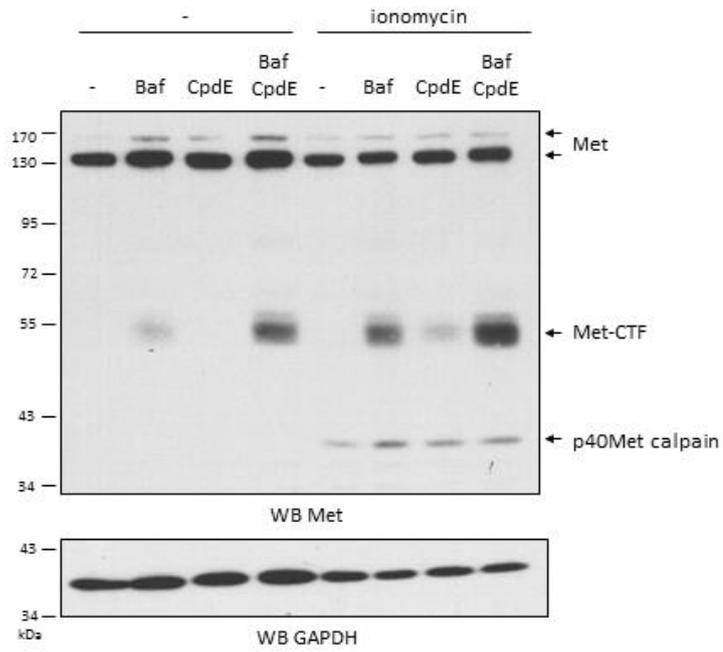


B



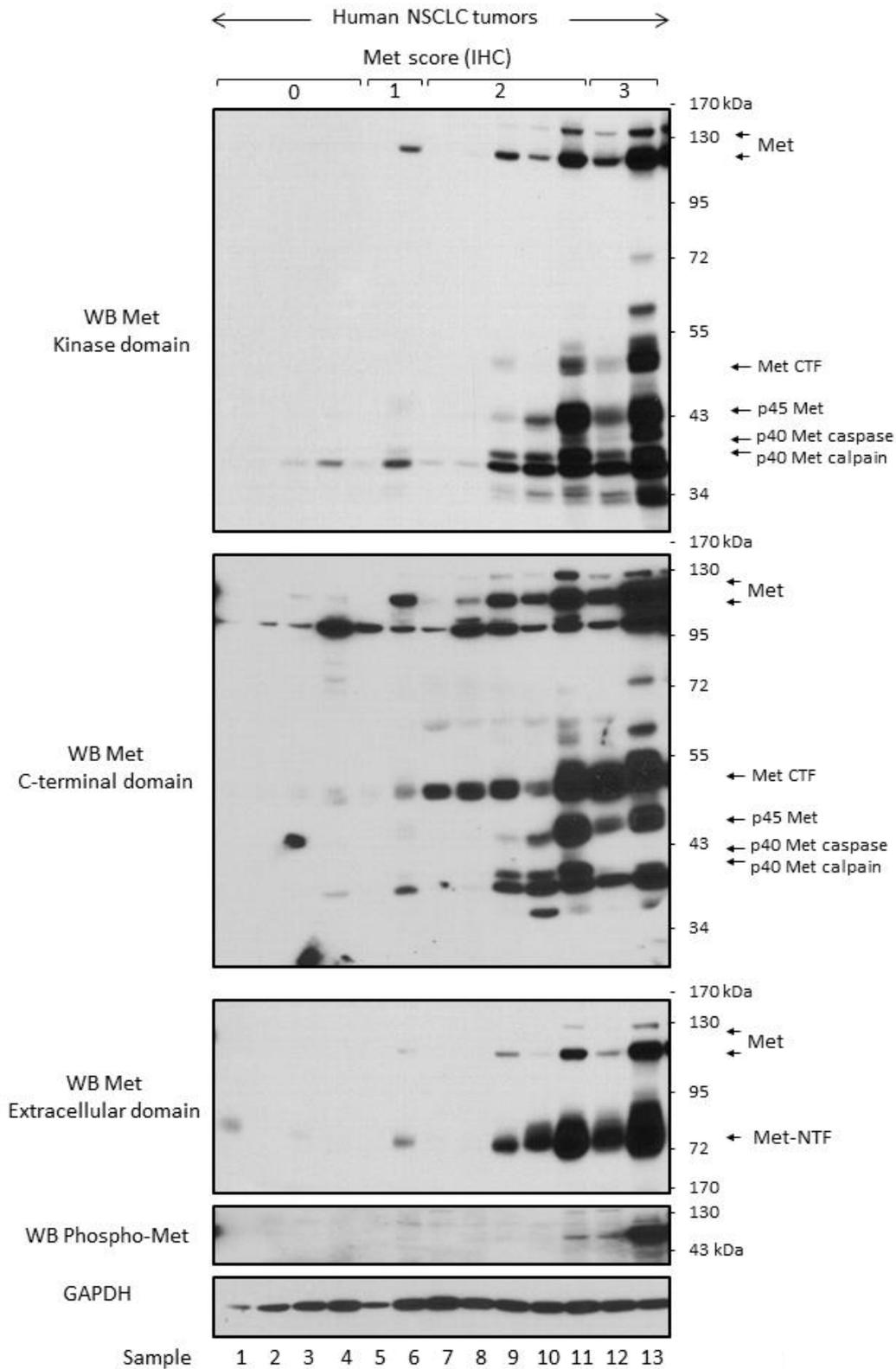
Supplementary Figure 3: calpains do not cleave the C-terminal tail of Met receptor

(A) Schematic representation of the cleavages sites of caspases and calpain : caspases cleave Met at the ESVD₁₀₀₂ and DNAD₁₃₇₆ sites, producing a p40 Met casp fragment lacking the few last C-terminal amino acid of Met (its C-terminal tail). This deletion is important for the pro-apoptotic properties of p40 Met casp. p40 Met calpain is still detected by SP44, an antibody directed against the C-terminal tail so it is not cleaved by calpain in this region. (B) MCF-10A cells were grown for 24 hours, serum starved overnight and treated with 1 μ M staurosporin for 6 hours or with 1 μ M ionomycin for 1 hour and analyzed by Western blotting with an antibody directed against the kinase domain of Met (3D4) or against its C-terminal tail (SP44).



Supplementary Figure 4:

MCF-10A cells were grown for 24h, serum starved and pretreated overnight with bafilomycin and/or E compound and treated 1h with 1 μ M ionomycin. Cell lysates were analyzed by western blot with an antibody directed against the Met kinase domain (intracellular Met) and GAPDH to assess the loading. Arrows indicate positions of full length Met, Met-NTF fragment and p40 Met calpain.



Supplementary Figure 5: Expression of Met and its fragments increases with IHC score

Tumor samples were analyzed by IHC to determine the level of Met expression. Tumors with scores of 0, 1, 2 and 3 were analyzed by Western blotting with an antibodies directed against the Met kinase domain, the Met C-terminal domain, the Met extracellular domain, phosphorylated Met (phospho-Met) and GAPDH to assess the loading.

Discussion

In preparation

Les résultats de ce manuscrit en préparation sont discutés en détails dans la partie DISCUSSION de la thèse.

DISCUSSION

Les fonctions des RTKs ont pendant longtemps été exclusivement associées à la présence de leur ligand. En absence de ce ligand, ils étaient considérés comme inactifs. Depuis, il a été découvert que les clivages protéolytiques des RTKs jouent un rôle dans la signalisation. Ainsi, en absence de ligand, plusieurs RTKs sont clivés par les caspases en fragment amplificateurs d'apoptose (Goldschneider and Mehlen, 2010). De plus, les clivages par le processus de PS-RIP de certains RTKs, comme ErbB4 ou Notch, génère des fragments capables de réguler la transcription de gènes cibles (Naresh et al., 2006; Hori et al., 2013).

Mon laboratoire a montré que le récepteur Met était également régulé par ce type de clivage protéolytique. En effet, le clivage par les caspases de Met génère un fragment amplificateur d'apoptose, p40 Met caspase (Tulasne et al., 2004; Lefebvre et al., 2013). De plus, Met est aussi la cible du PS-RIP, bien que les fragments générés soient très rapidement dégradés et semblent être des intermédiaires de dégradation (Foveau et al., 2009; Ancot et al., 2012).

Mes travaux de thèse ont permis de montrer que le récepteur Met est également la cible d'une autre famille de protéases, les calpaïnes. En effet, les calpaïnes réalisent deux clivages distincts du récepteur Met, chacun lié à un contexte cellulaire différent (Figure 23).

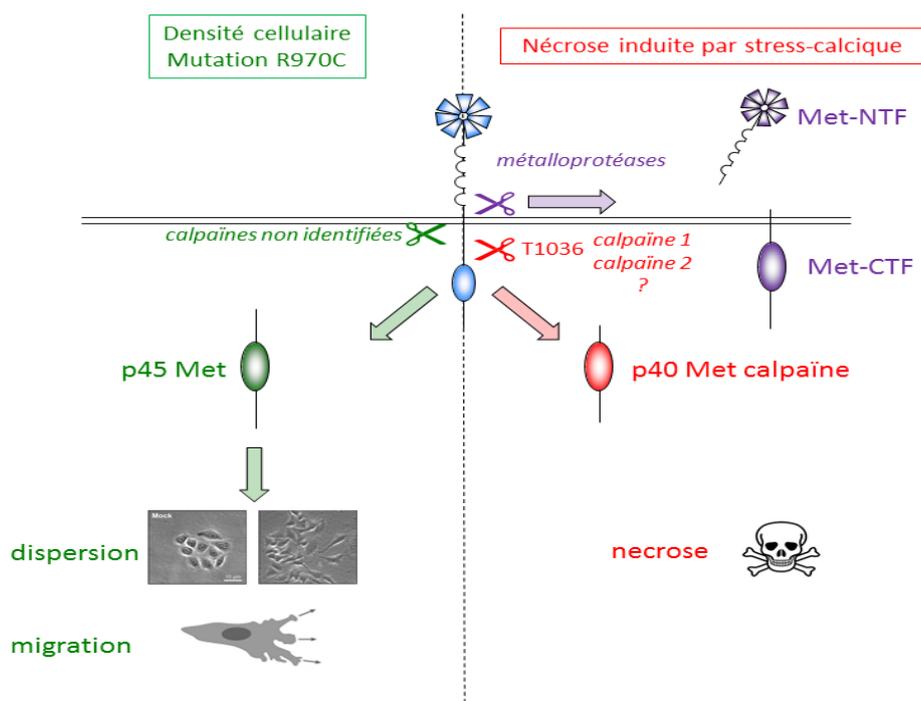


Figure 23 : Bilan des clivages du récepteur Met par les calpaïnes et les métalloprotéases membranaires

Gauche – La mutation R970C ainsi que la densité cellulaire favorisent le clivage de Met par les calpaïnes en un fragment d'environ 45kDa. La surexpression de p45 Met favorise la dispersion et la motilité cellulaire. Droite – Des ionophores du calcium comme l'ionomycine ou l'A23187 induisent la mort par nécrose des cellules. Cette mort cellulaire s'accompagne d'une dégradation du récepteur Met : il est clivé par les calpaïnes en un fragment de 40kDa, p40Met calpaïne doté d'une courte durée de vie et dénué d'activité cytotoxique et par les métalloprotéases membranaires en un fragment intracellulaire labile, Met-CTF et un fragment extracellulaire s'accumulant dans le milieu mais dénué de propriétés de leurre pour le ligand, Met-NTF.

I. La génération d'un fragment amplificateur de la motilité cellulaire

A) p45 Met est généré dans des conditions associées à la tumorigenèse

1) La mutation R970C et la densité cellulaire.

Dans un premier temps, j'ai pu montrer que la mutation R970C ainsi qu'une forte densité cellulaire induisent le clivage de Met en p45 Met par les calpaïnes et que ce fragment amplifie la motilité cellulaire. La mutation R970C touche le domaine juxtamembranaire de Met. Le récepteur Met est muté dans 3 à 10% des tumeurs pulmonaires et ces mutations sont principalement juxtamembranaires. Puisque ces mutations n'ont pas d'effet sur l'activité kinase de Met, il a été suggéré qu'elles pouvaient être de simples polymorphismes (Tyner et al., 2010). Cependant, il a été montré que les mutations R970C, P991S et T992I favorisent la

migration cellulaire ainsi que la formation de colonies en soft-agar et augmentation du niveau de ROS dans les cellules, des phénomènes qui pourraient favoriser la tumorigenèse (Ma et al., 2003; Jagadeeswaran et al., 2006). De plus, une étude de génétique associe la prédisposition aux cancers du poumon de la lignée de souris SWR/J à la mutation R968C du récepteur Met (Zaffaroni et al., 2005). Il est donc probable que les mutations juxtamembranaires, et notamment la mutation R970C, favorisent la transformation cellulaire par des mécanismes indépendants de l'activité kinase du récepteur Met.

Les mécanismes permettant à la mutation R970C de favoriser le clivage de Met en p45 Met n'ont pas été identifiés. Il est possible qu'elle crée un nouveau site de clivage pour les calpaïnes ou bien qu'elle favorise le clivage de Met sur un site de clivage proche. Dans ce cas, elle pourrait provoquer une modification de conformation de Met, permettant une meilleure accessibilité des calpaïnes à leur site de clivage.

En ce qui concerne la densité cellulaire, il est connu que cette condition augmente l'activité des calpaïnes ainsi que le clivage par ces protéases de certains substrats comme Myc (Conacci-Sorrell et al., 2010) ou le récepteur membranaire Frizzled-7. Le clivage de Myc en un fragment cytoplasmique stable, Myc-nick, entraîne l'acétylation par ce fragment de protéines favorisant l'autophagie mais aussi la motilité cellulaire (Conacci-Sorrell et al., 2010, 2014). Les calpaïnes clivent aussi le récepteur de Frizzled-7, dont l'activité est importante, suivant le contexte, pour le maintien de structures épithéliales polarisées ou au contraire l'acquisition d'une morphologie mésenchymateuse et d'un phénotype migratoire. Ce clivage favorise le recyclage de Frizzled 7 et semble important pour une activité optimale du récepteur puisque des mutants non clivables de Frizzled-7 ont une activité décriue (De Calisto et al., 2005; Linker et al., 2005; Struewing et al., 2007). La densité cellulaire favorise également le clivage de Met en p45 Met. Comme la quantité totale de Met pleine longueur n'est pas très affectée par ce phénomène, il peu probable qu'il s'agisse d'un mode de dégradation. Il est par contre possible que le fragment ainsi généré acquière de nouvelles propriétés.

La détection du fragment dans toutes les tumeurs surexprimant Met soulève également la question de savoir si sa production peut avoir lieu en absence de la mutation R970C. En effet, cette mutation ne concerne qu'environ 3% des cohortes étudiées et, même si le gène *met* n'a pas été séquencé dans nos échantillons, il est peu probable que l'ensemble de ceux-ci portent la mutation (Ma et al., 2003; Jagadeeswaran et al., 2006). Bien que nous l'ayons identifié dans le contexte très restreinte de la mutation R970C, le clivage du récepteur Met en p45 Met pourrait ainsi être un phénomène plus généralisé. Même si nous savons déjà que le p45 Met n'est pas généré dans les MDCK et est très peu produit dans les MCF-10A, il serait intéressant de vérifier la production de p45 Met, par exemple en condition de forte

densité cellulaire, dans un plus grand nombre de lignées cellulaires présentant une version sauvage du récepteur, qu'il s'agisse de lignées transformées ou cancéreuses. Il serait aussi intéressant de vérifier la production de p45 Met dans des cellules primaires. Des données préliminaires indiquent que le récepteur Met sauvage peut effectivement être clivé par les calpaïnes en p45 Met. Nous avons donc formulé l'hypothèse que certains facteurs, comme la densité cellulaires, induisent le clivage de Met en p45 Met tandis que d'autres, comme la mutation R970C, l'amplifient sans être nécessaires.

2) Rôle des facteurs de croissance HGF/SF et EGF

Afin de vérifier si d'autres stimuli favorisaient ce clivage, l'effet d'autres conditions sur la production de p45 Met a également été testé. Ainsi, l'ajout d'HGF/SF inhibe la production du p45 Met. Une hypothèse possible est qu'en présence de son ligand, le récepteur Met soit moins accessible en raison de sa dimérisation, qui entraîne sa phosphorylation et le recrutement de nombreux partenaires protéiques susceptibles de s'opposer au recrutement de la calpaïne 1 comme l'équipe l'a montré pour caspases. Il est également possible que le récepteur Met soit capable d'inhiber l'activité des calpaïnes. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de vérifier l'activité des calpaïnes au sein de cellules traitées ou non à l'HGF/SF, notamment en situation de confluence. Cependant, certains arguments s'opposent à cette hypothèse puisque Met et les calpaïnes sont importants pour les mêmes phénotypes, notamment la migration (Trusolino et al., 2010; Storr et al., 2011). En effet, la signalisation de Met depuis les endosomes favorise la migration cellulaire en induisant la relocalisation des protéines ERKs et Rac1 au niveau des points focaux d'adhésion (Liu et al., 2002; Ménard et al., 2014). La calpaïne 1 favorise indirectement le recrutement et l'activation de Rac1 au niveau de ces structures, suggérant une participation à la migration cellulaire par des voies de signalisation similaires à celles de Met (Bialkowska et al., 2000). A l'heure actuelle, il n'a pas été déterminé si ces deux mécanismes sont liés ou indépendants l'un de l'autre mais cette convergence de fonction et la similarité des voies de signalisation activées par Met et la calpaïne 1 s'opposent à l'hypothèse que l'activation de Met inhibe les calpaïnes. Au contraire, une étude a montré que l'ajout d'HGF/SF à des explants de reins induit l'activation de la PI3Kinase-C2 β *via* un clivage calpaïne spécifiquement au niveau de la membrane apicale (Crljen et al., 2002). Une autre explication à l'inhibition du clivage calpaïne de Met par sa propre activation serait que, suite à un traitement HGF/SF, Met et les calpaïnes relocalisent dans des endroits séparés. Par exemple il est connu que l'activation de Met induit son recrutement au niveau de microdomaines enrichis en cavéoline ou encore son internalisation dans les endosomes (Singleton et al., 2007; Barrow-McGee and Kermorgant, 2014). Il est possible que l'activation de Met favorise indirectement le recrutement des

calpaïnes au niveau d'un autre site cellulaire, diminuant ainsi le clivage de Met en p45 Met. Dans notre modèle cellulaire, déterminer l'activité ainsi que la localisation des calpaïnes en présence et en absence d'HGF/SF pourrait aider à expliquer pourquoi l'activation de Met inhibe son clivage par les calpaïnes.

Un effet de l'EGF sur le clivage de Met a aussi été mis en évidence, bien qu'assez ténu. Alors que plusieurs récepteurs membranaires, comme Notch et ErbB4, sont connus pour être clivés en réponse à leur ligand (Ni et al., 2001; Hori et al., 2013), nous montrons que le clivage d'un récepteur membranaire peut être sous le contrôle d'un autre facteur de croissance que son propre ligand. De manière intéressante, l'existence d'interactions entre Met et EGFR était déjà connue : il a en effet été montré que l'activation de l'un peut entraîner l'activation de l'autre dans les cellules cancéreuses (Jo et al., 2000; Bonine-Summers et al., 2007). De même, l'acquisition de résistances par les cellules cancéreuses aux thérapies ciblant l'un des deux récepteur peut être due à une suractivation de l'autre (Bean et al., 2007; Engelman et al., 2007; McDermott et al., 2010). De plus, il semble donc que le clivage de Met puisse aussi être induit par l'activation de l'EGFR. Cette observation est en accord avec le fait que certaines calpaïnes, comme la calpaïne 2, appartiennent aux voies de signalisation en aval de l'EGFR. En effet, il a été montré que la migration en réponse à l'EGF est médiée par la calpaïne 2 (Glading et al., 2001). Il serait intéressant de confirmer ces résultats en réalisant, en plus de la cinétique présentée dans cet article, un test dose de production de p45 Met en réponse à l'EGF. L'activation des calpaïnes par l'EGF étant médiée par la voie des MAPKinases, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques permettrait de vérifier si le clivage de Met en p45 Met est bien gouverné par cette voie. De manière intéressante, l'EGFR est suractivé dans de nombreux cancers, notamment dans des cancers du poumon. Cette suractivation implique souvent la présence de mutations activatrices au sein de la séquence de l'EGFR. Ces mutations peuvent être présentes au moment du diagnostiques ou émerger comme un mécanisme de résistance aux thérapies anti-EGFR.(Cortot and Jänne, 2014). Il serait donc intéressant de vérifier si la production de p45 Met est augmentée dans des lignées cellulaires ou des tumeurs présentant une activation aberrante de l'EGFR et si, au sein de ces lignée, l'inhibition du récepteur Met peut diminuer la production du fragment. En conclusion, la production du p45 Met est sous le contrôle de cytokines comme l'HGF/SF ou l'EGF. Celles-ci jouent des rôles opposés dans ce phénomène puisque l'activation de Met par son ligand inhibe son clivage tandis que l'activation de l'EGFR le favorise.

B) Vers la caractérisation du fragment p45 Met

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des calpaïnes comme la calpeptine ou l'ALLN m'a permis de les identifier comme les protéases à l'origine de la production de p45 Met. Les calpaïnes comptent cependant 14 membres, les formes majoritaires étant la calpaïne 1 et la calpaïne 2. La calpaïne impliquée dans ce clivage de Met n'a pas été identifiée à l'heure actuelle. En effet, un test de clivage *in vitro* de Met par la calpaïne 1 purifiée ne produit pas de p45 Met mais clive le récepteur Met en un fragment de 40kDa, le p40 Met calpaïne. Ce résultat suggère que la calpaïne 1 n'est pas impliquée dans la production de p45 Met. Comme le p45 Met n'est pas produit dans toutes les lignées cellulaires, il est possible que des calpaïnes non ubiquitaires produisent le p45 Met. Afin d'identifier la calpaïne impliquée, il serait possible de réaliser des tests de clivage *in vitro* avec d'autres calpaïnes comme la calpaïne 2. Il serait également envisageable de se replacer dans un contexte plus physiologique et, par exemple, d'observer l'effet de siRNAs ciblant les différentes calpaïnes au sein de lignées cellulaires comme les NCI-H1437. Cependant, il est possible que cette approche n'apporte aucune réponse puisque plusieurs calpaïnes pourraient réaliser le clivage de Met en p45 Met et la perte d'activité de l'une pourrait être compensée par l'activité des autres. C'est en effet le cas lors du clivage de Met en p40 Met calpaïnes induit par les ionophores du calcium : l'inhibition de l'expression de la calpaïne 1 ou de la calpaïne 2 n'a pas d'effet sur la production du fragment et seule l'extinction simultanée des deux calpaïnes induit une diminution du clivage.

Nous avons reconstitué le p45 Met en commençant le fragment au résidu C970. Cependant, nous n'avons pas la certitude d'avoir identifié le site de clivage car le poids moléculaire apparent de ce fragment est légèrement différent de celui du p45 Met endogène. La faible différence de poids moléculaire entre les deux fragments suggère toutefois un site de clivage proche du résidu 970, légèrement en C-terminal (Figure 24). L'analyse de cette zone par l'algorithme du site SitePrediction (<http://www.dnbr.ugent.be/prx/bioit2-public/SitePrediction/>) permet d'ailleurs d'identifier des zones potentielles de clivage proches du résidu 970. Afin de préciser ces observations et d'identifier le réel site de clivage, plusieurs approches sont envisageables. Par exemple il serait possible d'effectuer le clivage d'un récepteur Met recombinant par une calpaïne purifiée et de déterminer le site de clivage par spectrométrie de masse ou éventuellement en réalisant un séquençage d'Edman du fragment p45 Met purifié. Cependant, comme nous n'avons pas identifié de calpaïne permettant de produire du p45 Met *in vitro*, cette approche n'est pour l'instant pas réalisable. Une autre possibilité serait de réaliser des délétions mais celles-ci devraient être relativement larges, par exemple de 10 acides aminés, afin d'être capables d'inhiber un

clivage calpaïne (Conacci-Sorrell et al., 2010). Une fois la bonne région identifiée, il serait possible d'identifier un site de clivage potentiel et de réaliser la mutation ponctuelle de ses acides aminés, puisqu'il a été montré que des mutations ponctuelles au sein du site de clivage peuvent inhiber le clivage d'un substrat par les calpaïnes (Honda et al., 2004; Struewing et al., 2007; Conacci-Sorrell et al., 2010). Un travail certain reste donc à accomplir afin d'identifier la protéase impliquée dans le clivage du récepteur Met pleine longueur en p45 Met et de caractériser plus exactement ce fragment.

C) p45 Met présente une localisation nucléaire et pourrait jouer un rôle de régulateur de la transcription.

1) p45 Met présente une localisation nucléaire

Suite au clivage d'une protéine, le fragment généré peut présenter une nouvelle localisation cellulaire ainsi que de nouvelles fonctions. Par exemple les fragments issus du PS-RIP de Notch ou ErbB4 présentent une localisation nucléaire et exercent un rôle de facteur de transcription ou de cofacteur. (Hori et al., 2013; Wali et al., 2014). De même, le clivage de la filamine A par les calpaïnes en condition d'hypoxie génère un fragment qui agit comme un cofacteur du facteur de transcription HIF-1 α (Zheng et al., 2014). Ainsi, des clivages donnant des fragments nucléaires sont souvent liés à une activité transcriptionnelle. A l'inverse, le facteur de transcription Myc est clivé par les calpaïnes en un fragment Myc-nick, en condition de forte densité cellulaire. Myc-nick s'accumule dans le cytoplasme où il induit l'acétylation de protéines du cytosquelette. Ce processus est impliqué dans des situations physiologiques comme la fusion des myoblastes en myocytes mais augmente aussi la résistance des cellules cancéreuses à différents stress en favorisant l'autophagie (Conacci-Sorrell et al., 2010, 2014). Au regard de ces différentes informations, j'ai cherché à déterminer si le fragment p45 Met possédait une localisation cellulaire et une activité biologique spécifiques.

Dans une expérience de fractionnement cellulaire en NCI-H1437, nous avons pu montrer que p45 Met présente une localisation nucléaire ainsi qu'une localisation mitochondriale, suggérant la possible acquisition de nouvelles fonctions. Afin d'étudier les propriétés de p45 Met, mon équipe a généré des clones MDCK exprimant une version de Met commençant à l'acide aminé C970 et précédé d'une étiquette FLAG en N-terminal. Un test d'immunofluorescence a confirmé la localisation nucléaire du p45 Met au sein de ces clones mais, lors de cette expérience, je n'ai détecté aucune localisation mitochondriale en

effectuant des co-marquages avec une sonde spécifique des mitochondries, le mitotracker. Afin de confirmer ce résultat, il pourrait être utile de reproduire cette expérience en utilisant d'autres marqueurs des mitochondries comme un anticorps dirigé contre CoxIV. Une autre possibilité est que, dans l'expérience de fractionnement cellulaire, la fraction nucléaire ait contaminé la fraction mitochondriale, expliquant la localisation mitochondriale observée pour p45 Met. Les marqueurs contrôles des fractions nucléaires et mitochondriales se retrouvent d'ailleurs dans chacune des deux fractions, confirmant que noyau et mitochondries n'ont pas été nettement séparés. Dans les expériences d'immunofluorescence, le fragment p45 Met nucléaire est principalement détecté au sein de structures ponctuelles. Plusieurs structures de ce type, regroupées sous le nom de corps nucléaires, sont connues à l'heure actuelle. Par exemple l'expression des gènes a lieu au niveau de « transcription factories », ou usines à transcription, comprenant l'ARN polymérase II active, les ARNm naissants et des co-activateurs de l'ARN polymérase (Ghamari et al., 2013). D'autres corps nucléaires, comme les « speckles », sont impliqués dans le stockage et l'assemblage des facteurs réalisant l'épissage des ARNm. La synthèse des ARN ribosomiaux, quant à elle, est réalisée au niveau de structures appelées corps de Cajal (Lamond and Spector, 2003; Mao et al., 2011). Des expériences d'immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre des marqueurs spécifiques de ces différentes structures pourrait apporter des précisions sur la localisation du fragment p45 Met et fournir une indication indirecte sur sa fonction.

2) p45 Met est-il un (co-)facteur de transcription ?

La localisation nucléaire de p45 Met soulève la possibilité qu'il soit doté d'une activité transcriptionnelle. Ce type de mécanisme a déjà été démontré pour d'autres récepteurs membranaires comme Notch ou ErbB4, bien que le clivage de ces récepteurs soit induit par le ligand et réalisé par les protéases du PS-RIP (Hori et al., 2013; Wali et al., 2014). Il y a quelques années, une étude a montré un rôle transactivateur de fragments intracellulaires de Met proches du p45 Met mais ne présentant pas exactement le même poids moléculaire. En effet, dans cet article, des protéines de fusion associant ces fragments de Met au domaine de liaison à l'ADN Gal4 sont capables d'activer la transcription et la traduction d'un gène rapporteur précédé d'un promoteur contenant le site de fixation de Gal4. Dans cette étude, l'activité transcriptionnelle des fragments nécessite leur association avec le co-activateur YAP (Yes Associated Protein) et favorise la motilité cellulaire (Matteucci et al., 2009).

J'ai donc reconstruit ce type de vecteur et réalisé une protéine de fusion associant le domaine Gal4 au fragment de Met commençant au résidu C970. Cependant, dans des expériences préliminaires je n'ai pas pu montrer d'activité de ces constructions lors de tests

de transactivation utilisant le système Gal4-Luciférase. Ces tests ont été réalisés en absence et en présence de la protéine YAP et dans la même lignée cellulaire que l'équipe de Matteucci, les MDA-MB231, ainsi que dans les NCI-H1437. Ces expériences méritent cependant d'être poursuivies. Par exemple un site de localisation nucléaire dépendant du pH a récemment été identifié au niveau des acides aminés H1068-H1079, qui permet d'amplifier la localisation nucléaire de Met en cas d'acidification du cytoplasme. Il serait donc intéressant de vérifier la localisation cellulaire et l'activité transcriptionnelle de nos constructions après un traitement entraînant la diminution du pH cytoplasmique.

Dans le cas où p45 Met présenterait une fonction régulatrice de la transcription, une analyse transcriptomique de ses gènes cibles pourrait être envisagée. En effet, des expériences de puce à ARN ainsi que de Chip-seq ont permis d'identifier des gènes cibles de deux fragments différents d'ErbB4, impliqués par exemple dans la prolifération ou l'invasion. Ainsi, l'identification de ces gènes cibles a contribué à attribuer un rôle physiologique à chacun de ces fragments (Wali et al., 2014). De la même manière, l'identification des gènes cibles de p45 Met pourrait fournir des indications sur son ou ses rôle(s) biologique(s).

D) p45 Met augmente la motilité cellulaire

1) p45 Met amplifie la dispersion et la motilité en réponse au ligand

En utilisant les MDCK exprimant stablement p45 Met, j'ai également cherché à déterminer le(s) possible(s) rôle(s) biologique(s) de ce fragment. p45 Met n'induit pas de modification morphologique évidente au sein des cellules, ne modifie pas l'organisation du cytosquelette et n'altère pas non plus la prolifération. Cependant, il favorise la dispersion, c'est-à-dire la dissociation puis l'éloignement de cellules épithéliales préalablement regroupées en îlot. Il augmente aussi la motilité cellulaire dans des tests de vidéomicroscopie. Les calpaïnes sont connues pour jouer un rôle important dans la motilité cellulaire en favorisant l'assemblage des points focaux d'adhésion à l'avant des cellules et en participant à leur recyclage à l'arrière des cellules (Carragher et al., 2004; Leloup and Wells, 2011; Storr et al., 2011). Le clivage de Met en p45 Met pourrait constituer un de leurs mécanismes d'action. Par exemple dans le cas où son activité régulatrice de la transcription serait confirmée, la génération du p45 Met pourrait être un moyen pour les calpaïnes d'induire l'expression de gènes favorisant la motilité et/ou de réprimer celle de gènes favorisant l'adhérence cellulaire.

Dans nos expériences, la dispersion cellulaire est induite par l'HGF/SF. De même, dans nos tests de motilité, nous avons stimulé la migration des cellules par un traitement HGF/SF. Il est donc possible que la production du fragment p45 Met constitue un mode de signalisation original de Met ayant lieu conjointement à son activité tyrosine kinase et permettant d'amplifier les réponses cellulaires déclenchées par celle-ci. Cela a en effet été montré pour d'autres récepteurs, comme ErbB4, dont le ligand, l'heréguline, induit à la fois l'activité tyrosine kinase et le clivage en ErbB4-ICD (Ni et al., 2001). Cependant, cette idée d'une action conjointe de p45 Met avec la signalisation classique de Met, n'est pas en accord avec le fait que l'HGF/SF inhibe la production du fragment. Les phénotypes de dispersion et de migration peuvent être stimulés en l'absence d'activation de Met, grâce à d'autres facteurs de croissance, des cytokines ou des esters de phorbol (Glading et al., 2001; Chen, 2005). Il serait donc intéressant de vérifier si les résultats obtenus avec l'HGF/SF peuvent être reproduits en réponse à d'autres inducteurs de dispersion et de migration. Ces expériences permettraient de démontrer que le clivage par les calpaïnes du récepteur Met lui permet de participer à un phénotype de motilité cellulaire indépendamment de son activation par son ligand.

2) Des résultats à valider dans d'autres lignées.

Pour l'instant, la production du fragment p45 Met a surtout été détectée dans des lignées issues de cancers du poumon présentant la mutation R970C ou dans des lysats de cancers pulmonaires alors que nous avons testé son effet dans la lignée MDCK. Bien que les MDCK soient un modèle cellulaire qui a historiquement beaucoup servi à l'étude du récepteur Met, il serait intéressant de tester l'effet de p45 Met dans des lignées pulmonaires. Certaines études rapportant un effet plus marqué de fragment générés par les calpaïnes dans des lignées cancéreuses, ces clones pourraient donc être générés à partir de lignées issues de cancers du poumon (Conacci-Sorrell et al., 2014). Dans le cadre de la révision de article 1, ces expériences sont actuellement en cours. En effet nous sommes en train de générer des clones stables dans les lignées pulmonaires 16HBE-14o et A549. Les 16HBE-14o sont une lignée de cellules épithéliales pulmonaires transformées mais toujours polarisées. Les A549 sont par contre une lignée issue d'un cancer pulmonaire. Une fois les clones stables générés, nous chercherons à déterminer si le fragment p45 Met induit dans ces types cellulaires les mêmes phénotypes que chez les MDCK.

3) Le récepteur Met est-il impliqué dans d'autres phénotypes ?

En réponse à certains stimulus, le récepteur Met est clivé en un fragment p45 Met amplificateur de la motilité cellulaire. Cet effet de p45 Met peut être considéré comme une stratégie de survie face au stress que constitue une trop forte densité cellulaire et qui, à terme, peut induire la mort cellulaire. Dans le cas de la mutation R970C, qui est associée à une plus forte susceptibilité aux cancers du poumon, cette mutation pourrait amplifier la production de p45 Met dans les cellules, favorisant la transformation cellulaire et l'acquisition d'un phénotype plus agressif.

La production de p45 Met est assurée par les calpaïnes. Ces protéases médient d'autres phénotypes, comme l'invasion, grâce à l'induction de la production de protéases dégradant la matrice extracellulaire (Carragher et al., 2004; Mamoune et al., 2003; Xu and Deng, 2006). Il serait donc intéressant de tester, dans les clones exprimant stablement p45 Met, certains phénotypes comme l'invasion ou la croissance sans ancrage. Sans compter que l'activité des calpaïnes a été associée à une autophagie accrue (Demarchi et al., 2006; Cheng et al., 2008). Certains fragments issus d'un clivage calpaïne ont été associés à l'autophagie, comme Myc-nick ou le fragment de la β -caténine p75 (Conacci-Sorrell et al., 2014; Mancini et al., 2014). Il pourrait donc être intéressant d'évaluer un possible rôle de p45 Met dans ce phénomène en testant, par exemple, l'autophagie au sein des clones stables dans des situations comme une privation de sérum ou l'hypoxie.

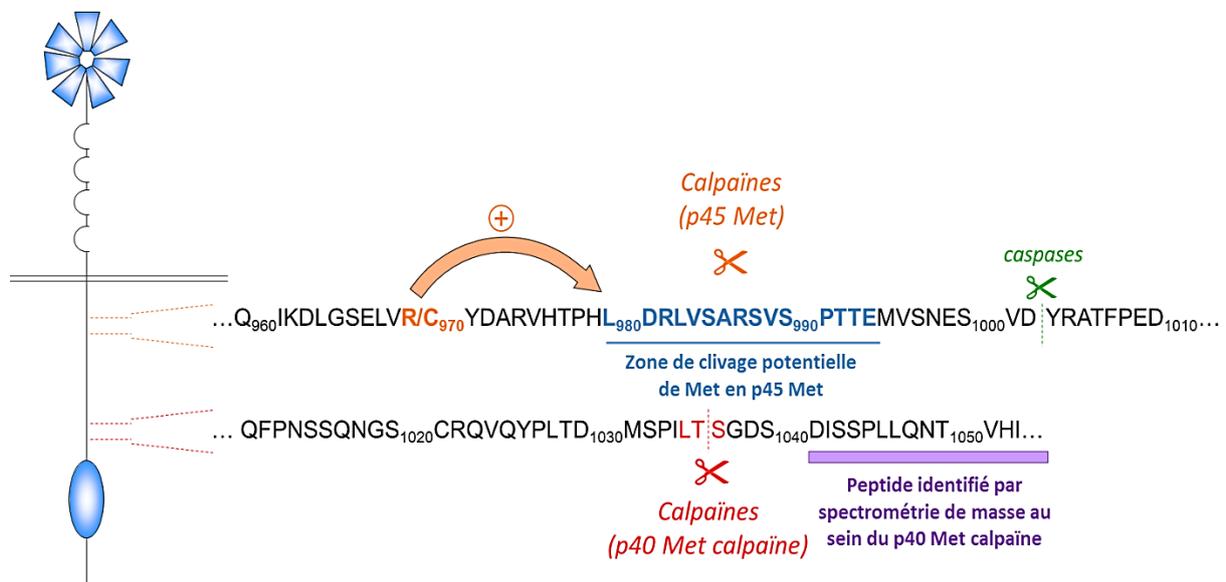


Figure 24 : Sites de clivage de Met par les calpaïnes.

Les séquences des zones au niveau desquelles ont lieu les clivages de Met sont indiquées. La zone de clivage potentielle de Met en p45 Met est indiquée en bleu, avec les délétions déjà réalisées. Le site de clivage de Met p40 Met calpaïne est indiqué en rouge et le peptide le plus en N-terminal de p40 Met identifié par spectrométrie de masse est indiqué en violet. Le site de clivage de Met par les caspases est figuré en vert.

II. Le récepteur Met est dégradé lors de la nécrose induite par stress calcique

A) L'induction de la nécrose par un stress calcique

1) Les ionophores du calcium induisent une mort cellulaire de type nécrotique

L'un des principaux inducteurs de l'activité des calpaïnes est le calcium. Dans le cadre de mon étude sur les clivages de Met par les calpaïnes j'ai donc été amené à utiliser des ionophores du calcium, comme l'ionomycine ou l'A23187, qui sont notamment connus pour induire la mort cellulaire. De manière intéressante, ces molécules n'induisent pas la production de p45 Met, bien qu'elles entraînent une dégradation efficace du récepteur Met plein longueur. Elles déclenchent par contre une mort cellulaire rapide et indépendante des caspases. Cette mort cellulaire présente les caractéristiques de la nécrose, comme la perte d'intégrité précoce de la membrane plasmique. Il a, de plus, été montré que les ionophores du calcium induisent l'ouverture du PTP, bien que nous n'ayons pas vérifié que c'était le cas dans notre modèle (Yun et al., 2014). Le traitement de cellules par l'A23187, y compris à des doses trop faibles pour déclencher la nécrose, induit l'activation de protéases comme les calpaïnes, les métalloprotéases membranaires et des protéases à sérine (Unemori and Werb, 1988). S'il a été montré que des inhibiteurs des protéases à sérine apportent une protection contre ce type de mort cellulaire (Yun et al., 2014), il serait par contre intéressant de déterminer l'importance des calpaïnes et des métalloprotéases dans cette mort cellulaire, surtout dans la mesure où celles-ci réalisent le clivage de notre protéine d'intérêt.

Les raisons pour lesquelles l'A23187 et l'ionomycine déclenchent une mort nécrotique alors que d'autres molécules provoquant un stress calcique au sein des cellules, comme la thapsigargine, induisent l'apoptose, ne sont pas connues. Cette différence pourrait s'expliquer par le mécanisme d'action de ces agents. En effet, la thapsigargine induit une déséquestration du calcium du réticulum endoplasmique en inhibant les pompes SERCA permettant le retour du calcium cytoplasmique dans le réticulum (Lytton et al., 1991). Cette augmentation de la concentration en calcium intracellulaire peut entraîner une entrée de calcium extracellulaire grâce à l'ouverture de canaux membranaires. L'ionomycine et l'A23187 sont classiquement considérés comme des ionophores du calcium favorisant directement le passage du calcium à travers la membrane plasmique. Leur propriété pronécrotique repose d'ailleurs sur la présence de calcium extracellulaire. Cependant, une étude suggère que cet influx calcique pourrait faire suite à une déséquestration des stocks calciques du réticulum endoplasmique (Morgan and Jacob, 1994). Une autre possibilité

serait que la différence entre apoptose et nécrose résulte de l'intensité du stress calcique, qui dans le cas de l'ionomycine et de l'A23187, serait suffisant pour déclencher la perméabilisation mitochondriale, la diminution brutale des stocks d'ATP et une mort cellulaire indépendante des caspases ne consommant pas d'énergie.

2) Le récepteur Met, un facteur de survie face à la nécrose

J'ai également pu démontrer qu'un traitement préalable des cellules à l'HGF/SF apporte une protection partielle contre la nécrose des cellules et contre le clivage calpaïne de Met. Cette observation est en accord avec le fait que le sérum joue également un rôle protecteur, vraisemblablement par le biais des nombreux facteurs de survie qu'il contient. De manière intéressante, il avait déjà été montré que l'Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) favorise la survie de cellules rétinienne face à la mort cellulaire induite par l'A23187 en augmentant l'expression de la calpastatine (Arroba et al., 2009). De plus, dans un modèle murin de dystrophie musculaire, l'IGF-1 réduit la dégradation excessive de protéine musculaires par les calpaïnes (Wingertzahn et al., 1998). Ainsi, il semble que les facteurs de croissance, ou au moins certains d'entre eux, jouent un rôle de protection contre la mort cellulaire induit par les ionophores du calcium et impliquant les calpaïnes.

Ces résultats sont à mettre en parallèle avec le rôle anti-apoptotique du couple HGF/SF-Met dans de nombreux types cellulaires. En effet, l'activation de Met apporte une protection contre la mort cellulaire induite par de nombreux agents pro-apoptotiques, notamment via l'activation de la voie PI3K/Akt (Longati et al., 1996; Yo et al., 1998). Le couple HGF/SF-Met semble donc également capable de favoriser la survie face à d'autres types de mort cellulaires que l'apoptose, reposant sur l'activation d'autres protéases que les caspases.

Les mécanismes permettant au récepteur Met ce rôle de protection ne sont pour l'instant pas identifiés. Une première explication est que le récepteur Met semble inhiber, ne serait-ce que partiellement, l'activité des calpaïnes. Il est donc possible que l'activation de Met inhibe certains effecteurs de cette mort cellulaire, comme les protéases à cystéines ou les protéases à sérine, par exemple en favorisant la synthèse d'inhibiteurs endogènes comme la calpastatine. Il est aussi possible qu'il diminue ou ralentisse l'influx de calcium extracellulaire dans la cellule, retardant l'effet de l'ionomycine. Il serait également intéressant d'identifier les voies de signalisation en aval de Met impliquées dans cette protection, par exemple grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de la voie Erk, comme ou PI3K/AKT.

B) Les calpaïnes dégradent Met en un fragment p40 Met calpaïne

Notre hypothèse initiale, en traitant des cellules à l'ionomycine et à l'A23187, était que ce traitement, en induisant l'activation des calpaïnes, amplifierait la production du fragment p45 Met. Au lieu de cela, j'ai constaté que ces traitements induisent une dégradation efficace du récepteur Met pleine longueur et génèrent un fragment d'environ 40kDa rappelant le fragment pro-apoptotique, p40 Met caspase. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques m'a permis d'identifier les calpaïnes comme les protéases responsables de ce clivage. Par analogie avec le fragment p40 Met caspase, nous avons appelé ce nouveau fragment p40 Met calpaïne. Ainsi, la même famille de protéase est impliquée dans la génération de deux fragments différents.

Il est possible que des calpaïnes différentes soient impliquées dans ces deux clivages distincts. Dans des conditions comme une forte densité cellulaires, les calpaïnes générant le p45 Met pourraient être préférentiellement activées tandis que, suite à un traitement à l'ionomycine ou à l'A23187, l'action des calpaïnes générant le p40 Met calpaïnes pourrait prédominer. Une autres possibilité serait que, durant la confluence, les calpaïnes impliquées dans la production du p45 soient relocalisées à proximité du récepteur Met tandis que, lors de la nécrose induite par stress calcique, le récepteur Met serait ciblé par les calpaïnes générant le p40 Met calpaïnes.

L'identité de ces différentes calpaïnes n'est par contre par clairement identifiée. Dans le cas du p40 Met calpaïne, il semble que la calpaïne 1 et la calpaïne 2 participent au clivage de Met puisque leur extinction simultanée entraîne une diminution de la génération du fragment. Cette observation a été partiellement confirmée par le fait que la calpaïne1 réalise le clivage de Met en p40 Met calpaïne *in vitro*. Cependant, l'inhibition du clivage de Met suite à l'extinction des calpaïnes 1 et 2 n'est pas totale, suggérant que d'autres calpaïnes sont aussi impliquées dans ce clivage.

Préciser l'identité des calpaïnes impliquée dans ces différents clivages est une tâche qui reste donc à accomplir. A l'heure actuelle, il n'existe pas d'inhibiteur spécifique de chaque calpaïne, mise à part certains inhibiteurs de la calpaïne 1 (Wang et al., 1996; Kling et al., 2010; Storr et al., 2011). Il serait par contre intéressant de tester l'effet d'autres siRNAs sur la génération de ces deux fragments. Dans le cas du fragment p40 Met calpaïnes, ces siRNAs seraient à tester en combinaison avec les siRNA dirigés contre les calpaïnes 1 et 2. Des tests de clivages *in vitro* de Met par des calpaïnes purifiées pourraient aussi permettre de déterminer l'implication de chacune d'elles dans ces deux clivages.

C) Identification du site de clivage par spectrométrie de masse

En l'absence de site consensus clairement défini pour les calpaïnes, nous avons choisi de déterminer le site de clivage par spectrométrie de masse. Après digestion de p40 Met purifié par différentes protéases, les peptides générés ont été identifiés par spectrométrie de masse afin de remonter jusqu'à l'extrémité N-terminale du fragment. Le premier peptide N-terminal identifié nous permet de délimiter une région en amont, dans laquelle le clivage pourrait avoir lieu. Au sein de cette région j'ai pu mettre en évidence, grâce à un logiciel de prédiction, un site de clivage potentiel, le LT₁₀₃₆-S₁₀₃₇ (Figure 24). En effet, ces acides aminés sont fréquemment retrouvés dans les sites de clivages de calpaïnes (Figure 18). Un fragment commençant au S1037 présente la même taille que le p40 Met calpaïne endogène suggérant que le bon site de clivage a été identifié.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons essayé de déterminer le site de clivage en recherchant par spectrométrie la masse totale du fragment p40 Met calpaïne sans digestion trypsique mais le pic obtenu était très large et donc pas assez précis pour conclure de manière définitive. Une autre solution sera d'essayer de générer une version non clivable du récepteur Met en remplaçant le site de clivage potentiel par une séquence d'acides aminés non clivable par les calpaïnes. Nous sommes actuellement en train de déterminer si la mutation de la séquence LT₁₀₃₆S₁₀₃₇ en MC₁₀₃₆W₁₀₃₇ peut inhiber la production de p40 Met calpaïne. En effet, le remplacement d'un site de clivage de la protéine Ras21 par cette séquence inhibe son clivage par la calpaïne 1 (Panigrahi et al., 2011). Il est également possible d'essayer de déléter ces acides aminés mais il semble que seule la délétion d'une zone étendue, par exemple d'au moins 10 acides aminés, peut réellement inhiber un clivage calpaïne (Conacci-Sorrell et al., 2010). Cette approche n'apporterait donc pas de précisions par rapport aux informations déjà obtenues.

D) Le p40 Met calpaïne présente une faible cytotoxicité

L'expérience de spectrométrie de masse ainsi que des expériences de Western blot utilisant un anticorps ciblant spécifiquement les derniers acides aminés de la queue C-terminale de Met montrent que ce peptide est conservé chez le p40 Met calpaïne, contrairement au p40 Met caspase. Cette délétion est nécessaire l'activation des propriétés apoptotiques de p40 Met caspases. Malgré cette différence, le p40 Met calpaïne est assez similaire au fragment caspase et il est lui aussi généré en condition de mort cellulaire. J'ai

donc cherché à savoir si le p40 Met calpaïne présente une activité cytotoxique. Des tests de clonogénicité montrent que, si le p40 Met caspase présente une forte activité cytotoxique, la transfection du p40 Met calpaïne à un effet beaucoup moins marqué. Ces résultats sont préliminaires et à reproduire afin de confirmer ou d'infirmer le faible effet cytotoxique observé pour le p40 Met calpaïne. De plus, le nombre de cellules transfectées par les différentes constructions et présentant dans lesquelles la caspase 3 est activée a été déterminé par immunofluorescence. La quantité de cellules transfectées par le p40 Met calpaïne et positive pour la caspase 3 active est similaire au contrôle négatif alors que l'activité pro-apoptotique du p40 Met caspase est nettement marquée. En somme, le fragment p40 Met calpaïne est beaucoup moins cytotoxique que le fragment p40 Met caspase.

A l'heure actuelle, la légère différence constatée entre l'effet cytotoxique des contrôles négatifs et du p40 Met calpaïne n'est pas expliquée. Il est possible que ce fragment possède une très légère activité cytotoxique. Cependant, dans nos conditions de traitement ionomycine, la mort cellulaire survient très rapidement (quelques heures) et le fragment calpaïne généré a une durée de vie assez courte. Il est donc peu probable que p40 Met calpaïne joue un rôle important dans la mort des cellules par nécrose, au moins dans nos conditions expérimentales. Pour en avoir la certitude, il serait cependant intéressant de générer des clones exprimant stablement le p40 Met calpaïne et d'évaluer leur sensibilité à l'apoptose mais aussi à la nécrose.

Une autre hypothèse est que ce léger effet cytoxique soit dû à un biais des expériences. En effet, la transfection transitoire et l'ajout d'un agent de sélection induisent un stress cellulaire (Lefebvre et al., 2013). Les caspases pourraient alors cliver le p40 Met calpaïne surexprimé dans les cellules, le déléter de sa queue C-terminale et ainsi amplifier ses capacités pro-apoptotiques. Le p40 Met calpaïne n'aurait donc pas d'activité cytotoxique par lui-même mais parce qu'il est facilement convertible en p40 Met caspase dans des cellules stressées.

E) Les métalloprotéases membranaires sont les principaux acteurs de la dégradation de Met

1) Les ionophores du calcium amplifient l'élagage de Met

Suite à l'induction d'un influx calcique dans les cellules, le récepteur Met est également clivé du côté extracellulaire par des métalloprotéases membranaires de la famille ADAM. Ce clivage, aussi appelé élagage, se produit de manière basale dans le cadre du PS-RIP de Met

(Figure 16). Il est alors principalement réalisé par ADAM10 et induit la production d'un fragment soluble N-terminal, Met-NTF, dans le milieu extracellulaire ainsi que la production d'un fragment intracellulaire labile d'environ 55 kDa, Met-CTF. ADAM 17 semble aussi impliqué dans le shedding de Met (Foveau et al., 2009; Schelter et al., 2010). J'ai pu montrer que les ionophores du calcium augmentent la production de Met-NTF et provoquent l'accumulation de Met-CTF dans le cytoplasme.

Il était déjà connu qu'un fort influx de calcium induit l'activité des métalloprotéases et l'élagage de protéines membranaires comme les CD (Clusters of Differentiation) CD44 et CD146 (Okamoto et al., 1999; Boneberg et al., 2009), des facteurs de croissance tels l'EGF, le HB-EGF (Heparin Binding EGF-like Growth Factor, un ligand de l'EGFR) et le TNF (Dethlefsen et al., 1998; Dong and Wiley, 2000; Mezyk-Kopeć et al., 2009) ou encore des récepteurs membranaires tels RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) ou le PDGFR (Galichet et al., 2008; Mendelson et al., 2010). Nous montrons que l'élagage de Met est aussi amplifié dans cette situation.

Actuellement, nous vérifions quelle(s) protéase(s) ADAM(s) est ou sont impliquée(s) dans l'amplification de l'élagage de Met en utilisant des siRNAs dirigés contre les métalloprotéases de la famille ADAM puis en vérifiant si l'ionomycine est toujours capable d'induire le shedding de Met. Nous nous concentrons sur ADAM10 et ADAM 17. Comme il est possible que plusieurs métalloprotéases soient capables de réaliser l'élagage de Met, l'extinction de l'expression d'une seule métalloprotéase à la fois n'apportera peut-être pas de résultat clair et seule l'extinction simultanée de plusieurs métalloprotéases pourrait être capable de l'inhiber.

2) Importance de l'élagage de Met pour sa dégradation et son inactivation durant la nécrose induite par stress calcique

De manière intéressante, le clivage métalloprotéase de Met semble être majoritairement impliqué dans sa dégradation puisque son inhibition permet de restaurer l'expression du récepteur Met pleine longueur, contrairement à l'inhibition des calpaïnes qui n'a un effet que très partiel sur l'expression du Met pleine longueur. Cependant, la restauration du Met pleine longueur n'est optimale qu'en inhibant simultanément les métalloprotéases et les calpaïnes, suggérant une collaboration de ces deux familles de protéases.

Afin de confirmer l'importance des métalloprotéases pour la dégradation et l'inactivation du récepteur Met, nous comptons utiliser des versions de Met non sujettes à l'élagage. Mon laboratoire a précédemment généré des protéines de fusion Trk-Met, qui expriment la partie extracellulaire du récepteur aux neurotrophines Trk-A et la partie intracellulaire de Met. Ces

fusions permettent de placer les réponses biologiques induites par Met sous le contrôle d'un autre facteur de croissance, le NGF. Dans des modèles cellulaires exprimant le récepteur Met mais pas le récepteur Trk-A, comme les MDCK, cette construction permet d'étudier des réponses cellulaires exclusivement dues à la construction transfectée et de s'affranchir de la présence du récepteur Met endogène. Un autre avantage de ces constructions est que la partie extracellulaire du récepteur Trk-A n'est pas clivable par les métalloprotéases (Foveau et al., 2009). Nous comptons donc vérifier si la version Trk-Met continue de s'exprimer suite à un traitement ionomycine et est toujours capable d'être phosphorylée en réponse à l'HGF/SF ou si les calpaïnes sont capables de prendre le relais des métalloprotéases.

Le rôle très majoritaire des métalloprotéases dans la dégradation de Met soulève la question de la raison du clivage de Met par les calpaïnes. Il est possible que ce clivage par deux familles de protéases différentes permette d'assurer la dégradation de Met dans le cas où l'une des deux est inactive ou non exprimée. Dans les tests de clonogénicité en HEK293T, le fragment p40 Met présente une activité cytotoxique bien inférieure au p40 Met calpaïne mais légèrement supérieure à un vecteur vide. Il se pourrait donc que le p40 Met calpaïne joue un rôle cytotoxique dans certains types de mort cellulaire. Comme les calpaïnes sont très importantes dans la mort de certains types de cellules nerveuses lors des maladies neurodégénératives, notamment en induisant la production de fragments cytotoxiques comme des fragments de la protéine tau ou la CRMP3 (Veeranna et al., 2004; Hou et al., 2013), il serait intéressant de vérifier si le p40 Met calpaïne s'accumule dans ce type cellulaire et y exerce une action cytotoxique particulière (Vosler et al., 2008; Yamashima, 2013).

3) Le fragment Met-NTF est-il un leurre au ligand ?

La partie extracellulaire de Met a été décrite comme un leurre au ligand dans plusieurs études. En effet, des vecteurs codant pour la partie extracellulaire de Met (decoyMet) seule ou bien fusionnée à la fraction constante des anticorps (Met-Fc) inhibent efficacement les réponses à l'HGF/SF telles que la migration cellulaire, l'invasion ou la morphogénèse de branchement. Elles inhibent également la croissance tumorale dans des expériences de xénogreffes (Michieli et al., 2004; Coxon et al., 2009). De même, lors de l'apoptose, le fragment N-terminal généré par les caspases, p100 Met est toujours capable de lier l'HGF/SF et d'inhiber sa signalisation, bien que, contrairement au Met-NTF, ce fragment soit toujours enchâssé dans la membrane (Deheuninck et al., 2008).

J'ai donc cherché à déterminer si le Met-NTF généré lors de la nécrose pouvait lui aussi agir comme un leurre au ligand et empêcher ainsi l'activation de Met par l'HGF/SF.

Cependant, le milieu conditionné de cellules traitées à l'ionomycine, contenant de fortes quantités de Met-NTF, n'inhibe pas l'activation de Met suite à l'ajout d'HGF/SF. A l'inverse, des quantités équivalentes de Met-Fc ont un effet inhibiteur de l'activation de Met. Cette différence de résultats peut s'expliquer par le fait que le Met-Fc est constitutivement dimérisé grâce à la partie Fc de la protéine, qui correspond à la fraction constante des anticorps. En effet, il est possible que la partie extracellulaire de Met ne joue un rôle de leurre que si elle est préalablement dimérisée, ce qui lui permettrait d'obtenir une plus forte affinité pour l'HGF/SF. Cette explication ne permet cependant pas de comprendre les différences observées entre nos résultats et le rôle de leurre des protéines decoyMet ou p100 Met.

Nous avons confirmé l'absence d'effet leurre du Met-NTF généré par un traitement par les ionophores du calcium grâce à des expériences de capture du fragment par K1, le site de liaison à Met de haute affinité de l'HGF/SF. En effet, la quantité de Met-NTF capturée par le K1 ne varie pas suite à un traitement ionomycine alors que la quantité de Met-NTF dans le milieu extracellulaire augmente fortement. Il semble donc que le Met-NTF généré lors la mort par nécrose des cellules ne soit pas doté de propriétés de leurre au ligand. Ces résultats sont étonnants puisque le fragment extracellulaire produit en conditions basales est capturé, contrairement au Met-NTF produit suite à l'ajout d'ionomycine. Il est possible que le Met NTF généré de manière basale soit dans une conformation spécifique lui permettant de lier le K1. A l'inverse, le fragment « excédentaire » produit suite au traitement ionomycine serait dans une conformation inactive, qui ne peut pas lier le K1 et n'inhiberait donc pas l'effet de l'HGF/SF sur les cellules voisines. D'une manière générale, les paramètres permettant au Met-NTF de lier l'HGF/SF et de jouer ou non un rôle de leurre au ligand sont encore mal compris et nécessitent d'avantage d'études.

III. Le récepteur Met est clivé dans des tumeurs pulmonaires

A) La détection de fragments de Met dans les tumeurs surexprimant Met

L'analyse de tumeurs pulmonaires par Western blot m'a permis de montrer que les différents clivages juxtamembranaires de Met identifiés dans mon laboratoire se produisent également dans des conditions pathologiques. En effet, les fragments déjà identifiés *in vitro* sont détectés au sein des tumeurs surexprimant Met : p40 Met calpaïne, p40 Met caspase,

p45 Met et Met-CTF pour les fragments intracellulaires mais aussi le Met-NTF (Figure 25). Ces fragments sont uniquement détectés dans les tumeurs surexprimant le récepteur Met pleine longueur, mise à part le p40 Met calpaïne, qui est également détecté dans certaines tumeurs de score 0 ou 1 et dans du tissu sain. Malgré la présence des fragments, ces résultats suggèrent que les expériences d'IHC dirigées contre Met sont des tests pertinents pour détecter l'expression de Met pleine longueur dans les tumeurs puisque son expression corrèle avec le score IHC des tumeurs. Cependant, le Met pleine longueur ne représente qu'une partie du Met détecté par IHC puisque son expression s'accompagne de la présence des différents fragments de Met, suggérant que la quantité de Met pleine longueur présente dans les cellules est actuellement surestimée.

La diversité des fragments de Met détectés dans les tumeurs est certainement due à la diversité des conditions rencontrées au sein des tumeurs. La présence du p40 Met calpaïne indique la dérégulation des calpaïnes, qui pourrait avoir lieu au niveau de zones nécrotiques, tandis que la détection du p40 Met caspase indique qu'une partie des cellules cancéreuses subit probablement un stress apoptotique. Nous pourrions ainsi chercher, sur des coupes de ces tumeurs, à mettre en évidence la présence de zones et de cellules apoptotiques et nécrotique et vérifier que celles-ci expriment bien du récepteur Met par IHC. La production du fragment p45 Met pourrait être due à la présence de zones de forte densité cellulaire, à moins que d'autres facteurs ne puissent induire sa génération. Enfin, la présence de Met-CTF et de Met-NTF indique une forte activité des métalloprotéases. Elle suggère également la saturation des voies permettant la dégradation du Met-CTF en temps normal. Il est à noter que des bandes à d'autres poids moléculaire sont observables. Elles reflètent certainement des fragments de récepteur Met encore non identifiés.

La simple analyse des tumeurs par Western blot ne permet pas de montrer si les fragments de Met sont produits dans des zones très distinctes des tumeurs ou bien s'ils peuvent au contraire être produits dans les mêmes zones, voire dans les mêmes cellules. La question se pose notamment dans le cas du p40 Met calpaïne et du p45 Met, qui sont tous deux générés par la même famille de protéases mais dans des conditions très différentes. La génération d'anticorps spécifiques d'une forme clivée de Met pourrait, par exemple, permettre d'obtenir plus de détails sur la localisation de chaque fragment au sein des tumeurs.

Certains de ces fragments ont une activité biologique *in vitro*. Il est donc vraisemblable qu'ils l'exercent au sein des cellules tumorales. L'activité potentielle des fragments étudiés au cours de ma thèse va spécifiquement être discutée.

B) p45 Met, un acteur de la tumorigenèse ?

De manière intéressante, le p45 Met est fortement produit dans les tumeurs. J'ai pu montrer un rôle de ce fragment dans la motilité cellulaire. Il est donc possible que p45 Met joue un rôle dans la progression de ces tumeurs. En effet, dans le cancer du poumon comme dans d'autres types de cancers, le récepteur Met est surexprimé dans un nombre élevé de patients. Cependant, son activation n'est détectée que dans une faible proportion de ces cancers. Par exemple dans une cohorte de cancers du poumon non à petite cellules, 22,2% des cancers présentent une surexpression de Met mais celui-ci n'est phosphorylé que dans 5,6% des tumeurs (Tsuta et al., 2012). La surexpression de Met est pourtant souvent corrélée à un mauvais pronostic (Park et al., 2012). La production de fragment p45 Met, qui favoriserait la motilité cellulaire pourrait donc être l'un des mécanismes grâce auxquels le récepteur Met favoriserait la progression et l'invasion indépendamment de son activité kinase. Cette hypothèse pourrait en partie expliquer l'échec récent de plusieurs essais de phase III d'inhibiteurs de Met comme l'Onartuzumab ou le Tivantinib. En effet, ceux-ci ciblent l'activité de Met mais pas la production de fragment. Si des fragments comme le p45 Met médient l'activité de Met dans ces tumeurs, cela pourrait expliquer à la fois l'association d'une surexpression de Met à un mauvais pronostic et l'incapacité des inhibiteurs de l'activité kinase de Met à apporter une amélioration.

Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des expériences de tumorigénicité *in vivo* par xénogreffes de lignées exprimant stablement le fragment p45 Met et de suivre l'évolution de paramètres tels que la croissance de la tumeur primaire mais aussi la survenue de métastases. Il serait aussi intéressant d'évaluer, dans une cohorte de patients, une potentielle corrélation entre p45 Met et de paramètres cliniques tels que l'agressivité de la tumeur ou le pronostic. Cependant, comme l'expression de p45 Met corréle avec celle du récepteur Met pleine longueur et des autres fragments, cette approche n'est pas possible.

C) p40 Met calpaïne, un fragment cytotoxique ?

Le fragment p40 Met calpaïne est aussi fortement produit dans les tumeurs. Sa ressemblance avec le fragment p40 Met caspase nous a d'abord laissé supposer qu'il pouvait avoir des propriétés cytotoxiques. Dans ce cas, son clivage par les calpaines aurait,

comme dans le cas du p40 Met caspase, transformé un oncogène associé à la transformation cellulaire et à un mauvais pronostic, en un fragment agissant comme un suppresseur de tumeur. Cependant, nous n'avons pas identifié de rôle cytotoxique évident pour p40 Met calpaïne. Il est donc possible que, malgré son abondance au sein des tumeurs, il constitue un simple produit de dégradation dénué d'activité biologique.

De manière intéressante, ce fragment est aussi détecté dans des tumeurs de score 0 et 1 n'exprimant que peu ou pas de récepteur Met ainsi que dans des échantillons de tissus sains. Cela pourrait être dû à la méthode de prélèvement des échantillons, qui implique de couper la circulation sanguine autour de la zone à prélever. Ce phénomène induit une situation d'ischémie au sein des tissus qui pourrait être à l'origine d'un début de nécrose, ou au moins de l'activation des calpaïnes. Une autre possibilité est que le fragment p40 Met calpaïne soit produit de manière basale et s'accumule dans ces tissus pour y exercer une fonction encore inconnue. Il serait donc intéressant de vérifier si un fragment de Met d'environ 40 kDa peut être détecté en conditions basales dans des lignées pulmonaires, voire des cellules primaires pulmonaires. Puisque p40 Met calpaïne contient le site de localisation nucléaire dépendant du pH de Met, il serait également intéressant de vérifier la localisation du p40 Met calpaïne et, en cas de localisation nucléaire, de déterminer s'il possède un rôle transactivateur.

Si ces expériences permettent de confirmer l'existence du p40 Met calpaïne en conditions basales, nous pourrions supposer qu'il possède un rôle non cytotoxique et, éventuellement, une implication dans des phénomènes biologiques autres que la mort cellulaire. Il sera alors intéressant de réaliser des clones stables ainsi que des tests phénotypiques afin de déterminer une éventuelle fonction du fragment, comme par exemple un rôle dans la survie, la prolifération ou encore la morphogénèse de branchement.

D) Un rôle suppresseur de tumeur pour Met-NTF ?

Le fragment Met-NTF est aussi détecté dans nos échantillons. Étant donné qu'il contient toujours le site de liaison à l'HGF/SF et que des données *in vitro* montrent un rôle de leurre au ligand pour des constructions similaires, il serait intéressant de supposer que ce Met-NTF sert lui aussi de leurre à l'HGF/SF du stroma (Michieli et al., 2004; Coxon et al., 2009). Ainsi, il aurait un rôle suppresseur de tumeur.

Cependant, les données concernant un rôle potentiel de ce fragment chez des patients sont contradictoires. D'un côté, une étude montre que du Met extracellulaire recombinant a

un effet anti-tumoral dans des tumeurs expérimentales (Michieli et al., 2004). Ces données sont supportées par le fait que, dans une cohorte de myélomes multiples, une légère diminution de Met-NTF est détectée dans le sérum des patients aux stades les plus avancés et que, dans une cohorte de cancers gastrique, la quantité de Met-NTF est plus faible chez les patients que chez les individus sains (Wader et al., 2011; Yang et al., 2013).

Cependant, nos résultats de capture du domaine K1 et de tests d'inhibition d'HGF/SF par du milieu conditionné de cellules nécrotiques riche en Met-NTF suggèrent cependant que ce fragment n'est pas capable d'inhiber l'action de l'HGF/SF. Dans ce cas, la baisse de Met-NTF dans le sérum pourrait refléter la perte de la capacité des cellules cancéreuses à dégrader le récepteur Met par clivage protéolytique. Ce phénomène favoriserait sa surexpression et pourrait donc être associé à la progression tumorale.

Dans une cohorte de patients atteints de cancers du poumon métastatiques, des résultats tout à fait inverses ont été obtenus. En effet, l'augmentation du taux de Met-NTF dans le sérum est un facteur de mauvais pronostic et corrèle avec la quantité totale de Met au sein de la tumeur primaire (Fu et al., 2013). Dans ce type de cancer, le Met-NTF pourrait donc ne pas avoir de rôle fonctionnel et constituer un marqueur pronostic. Etant donné l'aspect contradictoire de toutes ces études, le rôle du fragment Met-NTF ainsi que son statut de possible marqueur pronostic restent encore à préciser.

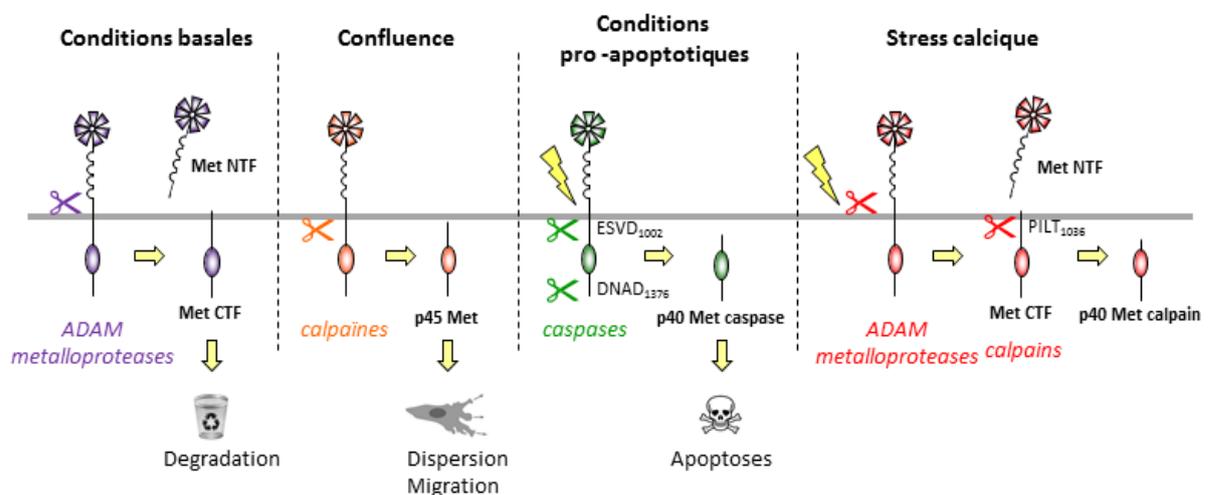


Figure 25 : Schéma des différents clivages de Met observés dans les tumeurs pulmonaires

De gauche à droite : PS-RIP de Met : en conditions basales, le récepteur Met est clivé par les métalloprotéases en un fragment Me-NTF extracellulaire et un fragment Met-CTF rapidement dégradé. Clivage calpaïne de Met en p45 Met : la mutation R970C et/ou la confluence favorisent le clivage de Met en p45 Met, un fragment nucléaire favorisant la motilité cellulaire. Clivage de Met en conditions apoptotiques : suivant un stress apoptotique, les caspases clivent Met en p40 Met caspase, un fragment amplificateur d'apoptose. Clivage de Met e conditions nécrotiques : suivant un stress calcique, le récepteur Met est à la fois clivé par les métalloprotéases membranaires en Met-NTF et Met-CTF et par les calpaines en p40 Met calpaïne.

En conclusion, les travaux effectués au laboratoire, notamment durant ma thèse, ont permis de découvrir de nouvelles situations durant lesquelles le récepteur Met est la cible de clivages protéolytiques et d'identifier une nouvelle classe de protéases impliquées dans ces clivages, les calpaïnes. De manière intéressante, les calpaïnes clivent le récepteur Met dans des situations bien distinctes, avec des conséquences fonctionnelles différentes. Dans certains cas, elles clivent le récepteur Met en un fragment p45 Met capable de favoriser la dispersion et la motilité cellulaire. Lors de la mort cellulaire par nécrose, Met est au contraire efficacement dégradé par les calpaïnes mais aussi par les métalloprotéases. De manière intéressante, l'ensemble de ces clivages semble avoir lieu simultanément dans des tumeurs pulmonaires surexprimant. Il serait maintenant intéressant d'approfondir l'étude du rôle de ces fragments, notamment lors de la tumorigenèse. L'approfondissement des effets biologiques du p45 Met ainsi que l'identification de son mécanisme d'action pourrait permettre d'identifier un nouveau biais par lequel le récepteur Met exerce son activité oncogénique indépendamment de son activité kinase. L'étude des fragments produits lors de la nécrose permettrait de déterminer s'ils jouent un rôle dans la mort cellulaire : cela permettrait de préciser si p40 Met calpaïne est doté de propriétés cytotoxiques et si le Met-NTF joue un rôle de leurre au ligand ou non. Ces résultats montrent que, malgré l'importance de leur activité kinase, les RTKs transmettent des informations aux cellules de plusieurs façons et que les clivages protéolytiques, en régulant leur expression ou en générant des fragments dotés de nouvelles propriétés, constituent un mécanisme de signalisation à part entière.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abella, J.V., Peschard, P., Naujokas, M.A., Lin, T., Saucier, C., Urbé, S., and Park, M. (2005). Met/Hepatocyte growth factor receptor ubiquitination suppresses transformation and is required for Hrs phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9632–9645.
- Abounader, R., and Laterra, J. (2005). Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumor growth and angiogenesis. *Neuro-Oncol.* 7, 436–451.
- Accordi, B., Pillozzi, S., Dell’Orto, M.C., Cazzaniga, G., Arcangeli, A., Kronnie, G.T., and Basso, G. (2007). Hepatocyte growth factor receptor c-MET is associated with FAS and when activated enhances drug-induced apoptosis in pediatric B acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 translocation. *J. Biol. Chem.* 282, 29384–29393.
- Ahmadzadeh, V., Farajnia, S., Feizi, M.A.H., and Nejad, R.A.K. (2014). Antibody humanization methods for development of therapeutic applications. *Monoclon. Antibodies Immunodiagn. Immunother.* 33, 67–73.
- Amemiya, H., Kono, K., Itakura, J., Tang, R.F., Takahashi, A., An, F.-Q., Kamei, S., Iizuka, H., Fujii, H., and Matsumoto, Y. (2002). c-Met expression in gastric cancer with liver metastasis. *Oncology* 63, 286–296.
- Anand, R., Kim, A.-Y., Brent, M., and Marmorstein, R. (2008). Biochemical analysis of MST1 kinase: elucidation of a C-terminal regulatory region. *Biochemistry (Mosc.)* 47, 6719–6726.
- Ancot, F., Leroy, C., Muharram, G., Lefebvre, J., Vicogne, J., Lemiere, A., Kherrouche, Z., Foveau, B., Pourtier, A., Melnyk, O., et al. (2012). Shedding-generated Met receptor fragments can be routed to either the proteasomal or the lysosomal degradation pathway. *Traffic Cph. Den.* 13, 1261–1272.
- 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, 254–266.
- Anguissola, S., Köhler, B., O’Byrne, R., Düsselmann, H., Cannon, M.D., Murray, F.E., Concannon, C.G., Rehm, M., Kögel, D., and Prehn, J.H.M. (2009). Bid and calpains cooperate to trigger oxaliplatin-induced apoptosis of cervical carcinoma HeLa cells. *Mol. Pharmacol.* 76, 998–1010.
- Arcila, M.E., Oxnard, G.R., Nafa, K., Riely, G.J., Solomon, S.B., Zakowski, M.F., Kris, M.G., Pao, W., Miller, V.A., and Ladanyi, M. (2011). Rebiopsy of Lung Cancer Patients with Acquired Resistance to EGFR Inhibitors and Enhanced Detection of the T790M Mutation Using a Locked Nucleic Acid-Based Assay. *Clin. Cancer Res.* 17, 1169–1180.
- Arroba, A.I., Wallace, D., Mackey, A., de la Rosa, E.J., and Cotter, T.G. (2009). IGF-I maintains calpastatin expression and attenuates apoptosis in several models of photoreceptor cell death. *Eur. J. Neurosci.* 30, 975–986.
- Arthur, J.S., Elce, J.S., Hegadorn, C., Williams, K., and Greer, P.A. (2000). Disruption of the murine calpain small subunit gene, *Capn4*: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4474–4481.
- Artus, C., Boujrad, H., Bouharrour, A., Brunelle, M.-N., Hoos, S., Yuste, V.J., Lenormand, P., Rousselle, J.-C., Namane, A., England, P., et al. (2010). AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX. *EMBO J.* 29, 1585–1599.
- Asami, O., Ihara, I., Shimidzu, N., Shimizu, S., Tomita, Y., Ichihara, A., and Nakamura, T. (1991). Purification and characterization of hepatocyte growth factor from injured liver of carbon tetrachloride-treated rats. *J. Biochem. (Tokyo)* 109, 8–13.
- Asaoka, Y., Tada, M., Ikenoue, T., Seto, M., Imai, M., Miyabayashi, K., Yamamoto, K., Yamamoto, S., Kudo, Y., Mohri, D., et al. (2010). Gastric cancer cell line Hs746T harbors a splice site mutation of c-Met causing juxtamembrane domain deletion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394, 1042–1046.
- Atencio, I.A., Ramachandra, M., Shabram, P., and Demers, G.W. (2000). Calpain inhibitor 1 activates p53-dependent apoptosis in tumor cell lines. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 247–253.
- Athauda, G., Giubellino, A., Coleman, J.A., Horak, C., Steeg, P.S., Lee, M.-J., Trepel, J., Wimberly, J., Sun, J., Coxon, A., et al. (2006). c-Met Ectodomain Shedding Rate Correlates with Malignant Potential. *Clin. Cancer Res.* 12, 4154–4162.
- Averna, M., De Tullio, R., Capini, P., Salamino, F., Pontremoli, S., and Melloni, E. (2003). Changes in calpastatin localization and expression during calpain activation: a new mechanism for the regulation of intracellular Ca(2+)-dependent proteolysis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 60, 2669–2678.
- Azam, M., Andrabi, S.S., Sahr, K.E., Kamath, L., Kuliopulos, A., and Chishti, A.H. (2001). Disruption of the Mouse -Calpain Gene Reveals an Essential Role in Platelet Function. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2213–2220.
- Bai, L., McEachern, D., Yang, C.-Y., Lu, J., Sun, H., and Wang, S. (2012). LRIG1 modulates cancer cell sensitivity to Smac mimetics by regulating TNF α expression and receptor tyrosine kinase signaling. *Cancer Res.* 72, 1229–1238.

- Bardelli, A., Corso, S., Bertotti, A., Hobor, S., Valtorta, E., Siravegna, G., Sartore-Bianchi, A., Scala, E., Cassingena, A., Zecchin, D., et al. (2013). Amplification of the MET Receptor Drives Resistance to Anti-EGFR Therapies in Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* 3, 658–673.
- Barrow-McGee, R., and Kermorgant, S. (2014). Met endosomal signalling: in the right place, at the right time. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 49, 69–74.
- 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, 21267–21277.
- Batandier, C., Lerverve, X., and Fontaine, E. (2004). Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* 279, 17197–17204.
- Bean, J., Brennan, C., Shih, J.-Y., Riely, G., Viale, A., Wang, L., Chitale, D., Motoi, N., Szoke, J., Broderick, S., et al. (2007). MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 20932–20937.
- Beckerle, M.C., Burrige, K., DeMartino, G.N., and Croall, D.E. (1987). Colocalization of calcium-dependent protease II and one of its substrates at sites of cell adhesion. *Cell* 51, 569–577.
- Bellon, S.F., Kaplan-Lefko, P., Yang, Y., Zhang, Y., Moriguchi, J., Rex, K., Johnson, C.W., Rose, P.E., Long, A.M., O'Connor, A.B., et al. (2008). c-Met inhibitors with novel binding mode show activity against several hereditary papillary renal cell carcinoma-related mutations. *J. Biol. Chem.* 283, 2675–2683.
- Berthou, S., Aebersold, D.M., Schmidt, L.S., Stroka, D., Heigl, C., Streit, B., Stalder, D., Gruber, G., Liang, C., Howlett, A.R., et al. (2004). The Met kinase inhibitor SU11274 exhibits a selective inhibition pattern toward different receptor mutated variants. *Oncogene* 23, 5387–5393.
- Bertotti, A., Comoglio, P.M., and Trusolino, L. (2006). Beta4 integrin activates a Shp2-Src signaling pathway that sustains HGF-induced anchorage-independent growth. *J. Cell Biol.* 175, 993–1003.
- 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, er11.
- Bialkowska, K., Kulkarni, S., Du, X., Goll, D.E., Saido, T.C., and Fox, J.E. (2000). Evidence that beta3 integrin-induced Rac activation involves the calpain-dependent formation of integrin clusters that are distinct from the focal complexes and focal adhesions that form as Rac and RhoA become active. *J. Cell Biol.* 151, 685–696.
- Billger, M., Wallin, M., and Karlsson, J.O. (1988). Proteolysis of tubulin and microtubule-associated proteins 1 and 2 by calpain I and II. Difference in sensitivity of assembled and disassembled microtubules. *Cell Calcium* 9, 33–44.
- 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.
- Blanchard, H., Grochulski, P., Li, Y., Arthur, J.S., Davies, P.L., Elce, J.S., and Cygler, M. (1997). Structure of a calpain Ca(2+)-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca(2+)-induced conformational changes. *Nat. Struct. Biol.* 4, 532–538.
- Blomgren, K., Zhu, C., Wang, X., Karlsson, J.O., Leverin, A.L., Bahr, B.A., Mallard, C., and Hagberg, H. (2001). Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of “pathological apoptosis”? *J. Biol. Chem.* 276, 10191–10198.
- Boccaccio, C., Andò, 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, 285–288.
- Bodnar, R.J., Yates, C.C., and Wells, A. (2006). IP-10 blocks vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and tube formation via inhibition of calpain. *Circ. Res.* 98, 617–625.
- Bodnar, R.J., Yates, C.C., Rodgers, M.E., Du, X., and Wells, A. (2009). IP-10 induces dissociation of newly formed blood vessels. *J. Cell Sci.* 122, 2064–2077.
- Boneberg, E.-M., Illges, H., Legler, D.F., and Fürstenberger, G. (2009). Soluble CD146 is generated by ectodomain shedding of membrane CD146 in a calcium-induced, matrix metalloprotease-dependent process. *Microvasc. Res.* 78, 325–331.
- Bonine-Summers, A.R., Aakre, M.E., Brown, K.A., Arteaga, C.L., Pietenpol, J.A., Moses, H.L., and Cheng, N. (2007). Epidermal growth factor receptor plays a significant role in hepatocyte growth factor mediated biological responses in mammary epithelial cells. *Cancer Biol. Ther.* 6, 561–570.
- 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, 10608–10613.
- Bottaro, D.P., Rubin, J.S., Falletto, 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, 802–804.
- Braun, C., Engel, M., Seifert, M., Theisinger, B., Seitz, G., Zang, K.D., and Welter, C. (1999). Expression of calpain I messenger RNA in human renal cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and histological type. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 84, 6–9.
- Brinkmann, V., Foroutan, H., Sachs, M., Weidner, K.M., and Birchmeier, W. (1995). Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 131, 1573–1586.

- Bussolino, F., Di Renzo, M.F., Ziche, M., Bocchietto, E., Olivero, M., Naldini, L., Gaudino, G., Tamagnone, L., Coffer, 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, 629–641.
- De Calisto, J., Araya, C., Marchant, L., Riaz, C.F., and Mayor, R. (2005). Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Dev. Camb. Engl.* 132, 2587–2597.
- Calvi, C., Podowski, M., Lopez-Mercado, A., Metzger, S., Misono, K., Malinina, A., Dikeman, D., Poonyagariyon, H., Ynalvez, L., Derakhshandeh, R., et al. (2013). Hepatocyte growth factor, a determinant of airspace homeostasis in the murine lung. *PLoS Genet.* 9, e1003228.
- Camidge, D.R., Ou, S.-H.I., Shapiro, G., Otterson, G.A., Villaruz, L.C., Villalona-Calero, M.A., Iafrate, A.J., Varella-Garcia, M., Dacic, S., Cardarella, S., et al. (2014). Efficacy and safety of crizotinib in patients with advanced c-MET-amplified non-small cell lung cancer (NSCLC). *J. Clin. Oncol.* 32:5s.
- Campbell, D.B., Sutcliffe, J.S., Ebert, P.J., Militerni, R., Bravaccio, C., Trillo, S., Elia, M., Schneider, C., Melmed, R., Sacco, R., et al. (2006). A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 16834–16839.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 511, 543–550.
- Cao, G., Xing, J., Xiao, X., Liou, A.K.F., Gao, Y., Yin, X.-M., Clark, R.S.B., Graham, S.H., and Chen, J. (2007). Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 9278–9293.
- Cao, X., Deng, X., and May, W.S. (2003). Cleavage of Bax to p18 Bax accelerates stress-induced apoptosis, and a cathepsin-like protease may rapidly degrade p18 Bax. *Blood* 102, 2605–2614.
- Carragher, N. (2006). Calpain Inhibition: A Therapeutic Strategy Targeting Multiple Disease States. *Curr. Pharm. Des.* 12, 615–638.
- Carragher, N.O., Levkau, B., Ross, R., and Raines, E.W. (1999). Degraded collagen fragments promote rapid disassembly of smooth muscle focal adhesions that correlates with cleavage of pp125(FAK), paxillin, and talin. *J. Cell Biol.* 147, 619–630.
- Carragher, N.O., Fonseca, B.D., and Frame, M.C. (2004). Calpain activity is generally elevated during transformation but has oncogene-specific biological functions. *Neoplasia N. Y. N* 6, 53–73.
- Carragher, N.O., Walker, S.M., Scott Carragher, L.A., Harris, F., Sawyer, T.K., Brunton, V.G., Ozanne, B.W., and Frame, M.C. (2006). Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and amoeboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function. *Oncogene* 25, 5726–5740.
- Cartron, P.-F., Oliver, L., Juin, P., Meflah, K., and Vallette, F.M. (2004). The p18 truncated form of Bax behaves like a Bcl-2 homology domain 3-only protein. *J. Biol. Chem.* 279, 11503–11512.
- Catenacci, D.V.T., Henderson, L., Xiao, S.-Y., Patel, P., Yauch, R.L., Hegde, P., Zha, J., Pandita, A., Peterson, A., and Salgia, R. (2011). Durable complete response of metastatic gastric cancer with anti-Met therapy followed by resistance at recurrence. *Cancer Discov.* 1, 573–579.
- Caulin, C., Salvesen, G.S., and Oshima, R.G. (1997). Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J. Cell Biol.* 138, 1379–1394.
- Cepero, V., Sierra, J.R., Corso, S., Ghiso, E., Casorzo, L., Perera, T., Comoglio, P.M., and Giordano, S. (2010). MET and KRAS gene amplification mediates acquired resistance to MET tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res.* 70, 7580–7590.
- 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.
- Chan, A.M., King, H.W., Deakin, E.A., Tempest, P.R., Hilken, J., Kroezen, V., Edwards, D.R., Wills, A.J., Brookes, P., and Cooper, C.S. (1988). Characterization of the mouse met proto-oncogene. *Oncogene* 2, 593–599.
- Chen, H.-C. (2005). Cell-scatter assay. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 294, 69–77.
- 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, 5155–5167.
- Chen, J.-T., Huang, C.-Y., Chiang, Y.-Y., Chen, W.-H., Chiou, S.-H., Chen, C.-Y., and Chow, K.-C. (2008). HGF Increases Cisplatin Resistance via Down-Regulation of AIF in Lung Cancer Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 38, 559–565.
- Chen, L., Feng, X.C., Zhang, W.G., Xu, X.L., and Zhou, G.H. (2012). Effects of inhibitors on the synergistic interaction between calpain and caspase-3 during post-mortem aging of chicken meat. *J. Agric. Food Chem.* 60, 8465–8472.
- Chen, Y.Q., Hsieh, J.T., Yao, F., Fang, B., Pong, R.C., Cipriano, S.C., and Krepulat, F. (1999). Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene* 18, 2747–2754.
- Cheng, Y., Qiu, F., Huang, J., Tashiro, S.-I., Onodera, S., and Ikejima, T. (2008). Apoptosis-suppressing and autophagy-promoting effects of calpain on oridonin-induced L929 cell death. *Arch. Biochem. Biophys.* 475, 148–155.
- 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, 29352–29358.
- Chmielowiec, J., Borowiak, M., Morkel, M., Stradal, T., Munz, B., Werner, S., Wehland, J., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2007a). c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol* 177, 151–162.
- Chmielowiec, J., Borowiak, M., Morkel, M., Stradal, T., Munz, B., Werner, S., Wehland, J., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2007b). c-Met is essential for wound healing in the skin. *J. Cell Biol.* 177, 151–162.

- Choueiri, T.K., Vaishampayan, U., Rosenberg, J.E., Logan, T.F., Harzstark, A.L., Bukowski, R.M., Rini, B.I., Srinivas, S., Stein, M.N., Adams, L.M., et al. (2013). Phase II and biomarker study of the dual MET/VEGFR2 inhibitor foretinib in patients with papillary renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 181–186.
- Christensen, J.G., Schreck, R., Burrows, J., Kuruganti, P., Chan, E., Le, P., Chen, J., Wang, X., Ruslim, L., Blake, R., et al. (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, 7345–7355.
- Citron, M. (2004). Beta-secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease--promise and challenge. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 92–97.
- Coltella, N., Rasola, A., Nano, E., Bardella, C., Fassetta, M., Filigheddu, N., Graziani, A., Comoglio, P.M., and Di Renzo, M.F. (2006). p38 MAPK turns hepatocyte growth factor to a death signal that commits ovarian cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 118, 2981–2990.
- Comito, G., Calvani, M., Giannoni, E., Bianchini, F., Calorini, L., Torre, E., Migliore, C., Giordano, S., and Chiarugi, P. (2011). HIF-1 α stabilization by mitochondrial ROS promotes Met-dependent invasive growth and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 893–904.
- Comoglio, P.M., Boccaccio, C., and Trusolino, L. (2003). Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 565–571.
- Conacci-Sorrell, M., Ngouenet, C., and Eisenman, R.N. (2010). Myc-nick: a cytoplasmic cleavage product of Myc that promotes alpha-tubulin acetylation and cell differentiation. *Cell* 142, 480–493.
- Conacci-Sorrell, M., Ngouenet, C., Anderson, S., Brabletz, T., and Eisenman, R.N. (2014). Stress-induced cleavage of Myc promotes cancer cell survival. *Genes Dev.* 28, 689–707.
- Connem, C.P., and Halestrap, A.P. (1992). Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. *Biochem. J.* 284 (Pt 2), 381–385.
- 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, 5131–5137.
- Conrotto, P., Valdembrì, D., Corso, S., Serini, G., Tamagnone, L., Comoglio, P.M., Bussolino, F., and Giordano, S. (2005). Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1. *Blood* 105, 4321–4329.
- Cooke, V.G., LeBleu, V.S., Keskin, D., Khan, Z., O'Connell, J.T., Teng, Y., Duncan, M.B., Xie, L., Maeda, G., Vong, S., et al. (2012). Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway. *Cancer Cell* 21, 66–81.
- 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.
- Corso, S., and Giordano, S. (2013). Cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms of HGF/MET-driven resistance to targeted therapies: from basic research to a clinical perspective. *Cancer Discov.* 3, 978–992.
- Corso, S., Ghiso, E., Cepero, V., Sierra, J.R., Migliore, C., Bertotti, A., Trusolino, L., Comoglio, P.M., and Giordano, S. (2010). Activation of HER family members in gastric carcinoma cells mediates resistance to MET inhibition. *Mol. Cancer* 9, 121.
- Cortesina, G., Martone, T., Galeazzi, E., Olivero, M., De Stefani, A., Bussi, M., Valente, G., Comoglio, P.M., and Di Renzo, M.F. (2000). Staging of head and neck squamous cell carcinoma using the MET oncogene product as marker of tumor cells in lymph node metastases. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 89, 286–292.
- Cortot, A.B., and Jänne, P.A. (2014). Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* 23, 356–366.
- Coxon, A., Rex, K., Meyer, S., Sun, J., Sun, J., Chen, Q., Radinsky, R., Kendall, R., and Burgess, T.L. (2009). Soluble c-Met receptors inhibit phosphorylation of c-Met and growth of hepatocyte growth factor: c-Met-dependent tumors in animal models. *Mol. Cancer Ther.* 8, 1119–1125.
- 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 (Mosc.)* 44, 14110–14119.
- Crljen, V., Volinia, S., and Banfic, H. (2002). Hepatocyte growth factor activates phosphoinositide 3-kinase C2 beta in renal brush-border plasma membranes. *Biochem. J.* 365, 791–799.
- Crompton, M., Ellinger, H., and Costi, A. (1988). Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* 255, 357–360.
- Cuevas, B.D. (2003). MEKK1 regulates calpain-dependent proteolysis of focal adhesion proteins for rear-end detachment of migrating fibroblasts. *EMBO J.* 22, 3346–3355.
- Curry, M.C., Peters, A.A., Kenny, P.A., Roberts-Thomson, S.J., and Monteith, G.R. (2013). Mitochondrial calcium uniporter silencing potentiates caspase-independent cell death in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 695–700.
- Czogalla, A., and Sikorski, A.F. (2005). Spectrin and calpain: a “target” and a “sniper” in the pathology of neuronal cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 62, 1913–1924.
- Date, K., Matsumoto, K., Shimura, H., Tanaka, M., and Nakamura, T. (1997). HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor. *FEBS Lett.* 420, 1–6.
- Dayton, W.R., Schollmeyer, J.V., Lepley, R.A., and Cortés, L.R. (1981). A calcium-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Isolation of a low-calcium-requiring form of the protease. *Biochim. Biophys. Acta* 659, 48–61.

- 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.
- 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, 1455–1463.
- Delavallée, L., Cabon, L., Galán-Malo, P., Lorenzo, H.K., and Susin, S.A. (2011). AIF-mediated caspase-independent necroptosis: A new chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life* 63, 221–232.
- Delcros, J.-G., and Mehlen, P. (2013). [Dependence receptors: life or death choices]. *Bull. Cancer (Paris)* 100, 1261–1274.
- Demarchi, F., Bertoli, C., Copetti, T., Tanida, I., Brancolini, C., Eskelinen, E.-L., and Schneider, C. (2006). Calpain is required for macroautophagy in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 175, 595–605.
- Dethlefsen, S.M., Raab, G., Moses, M.A., Adam, R.M., Klagsbrun, M., and Freeman, M.R. (1998). Extracellular calcium influx stimulates metalloproteinase cleavage and secretion of heparin-binding EGF-like growth factor independently of protein kinase C. *J. Cell. Biochem.* 69, 143–153.
- Ding, L., Getz, G., Wheeler, D.A., Mardis, E.R., McLellan, M.D., Cibulskis, K., Sougnez, C., Greulich, H., Muzny, D.M., Morgan, M.B., et al. (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455, 1069–1075.
- Dong, J., and Wiley, H.S. (2000). Trafficking and proteolytic release of epidermal growth factor receptor ligands are modulated by their membrane-anchoring domains. *J. Biol. Chem.* 275, 557–564.
- Dutt, P., Croall, D.E., Arthur, J.S.C., Veyra, T.D., Williams, K., Elce, J.S., and Greer, P.A. (2006). m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice. *BMC Dev. Biol.* 6, 3.
- duVerle, D., Takigawa, I., Ono, Y., Sorimachi, H., and Mamitsuka, H. (2010). CaMPDB: a resource for calpain and modulatory proteolysis. *Genome Inform. Int. Conf. Genome Inform.* 22, 202–213.
- Eathiraj, S., Palma, R., Volckova, E., Hirschi, M., France, D.S., Ashwell, M.A., and Chan, T.C.K. (2011). Discovery of a novel mode of protein kinase inhibition characterized by the mechanism of inhibition of human mesenchymal-epithelial transition factor (c-Met) protein autophosphorylation by ARQ 197. *J. Biol. Chem.* 286, 20666–20676.
- Ebos, J.M.L., Lee, C.R., Cruz-Munoz, W., Bjamason, G.A., Christensen, J.G., and Kerbel, R.S. (2009). Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 15, 232–239.
- Eguchi, Y., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* 57, 1835–1840.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.
- 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, 1039–1043.
- Ephstein, Y., Singleton, P.A., Chen, W., Wang, L., Salgia, R., Kanteti, P., Dudek, S.M., Garcia, J.G.N., and Jacobson, J.R. (2013). Critical role of S1PR1 and integrin β 4 in HGF/c-Met-mediated increases in vascular integrity. *J. Biol. Chem.* 288, 2191–2200.
- Fan, D.-G., Dai, J.-Y., Tang, J., Wu, M.-M., Sun, S.-G., Jiang, J.-L., and Fan, Q.-Y. (2009). Silencing of calpain expression reduces the metastatic potential of human osteosarcoma cells. *Cell Biol. Int.* 33, 1263–1267.
- Fearon, E.R., Cho, K.R., Nigro, J.M., Kern, S.E., Simons, J.W., Ruppert, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Thomas, G., and Kinzler, K.W. (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247, 49–56.
- 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, 19558–19564.
- 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, 739–749.
- Ferraro, D., Corso, S., Fasano, E., Panieri, E., Santangelo, R., Borrello, S., Giordano, S., Pani, G., and Galeotti, T. (2006). Pro-metastatic signaling by c-Met through RAC-1 and reactive oxygen species (ROS). *Oncogene* 25, 3689–3698.
- Fixman, E.D., Fournier, T.M., Kamikura, D.M., Naujokas, M.A., and Park, M. (1996). Pathways downstream of Shc and Grb2 are required for cell transformation by the tpr-Met oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 271, 13116–13122.
- Fixman, E.D., Holgado-Madruga, M., Nguyen, L., Kamikura, D.M., Fournier, T.M., Wong, A.J., and Park, M. (1997). Efficient cellular transformation by the Met oncoprotein requires a functional Grb2 binding site and correlates with phosphorylation of the Grb2-associated proteins, Cbl and Gab1. *J. Biol. Chem.* 272, 20167–20172.
- Follenzi, A., Bakovic, S., Gual, P., Stella, M.C., Longati, P., and Comoglio, P.M. (2000). Cross-talk between the proto-oncogenes Met and Ron. *Oncogene* 19, 3041–3049.
- Forcet, C., Ye, X., Granger, L., Corset, V., Shin, H., Bredesen, D.E., and Mehlen, P. (2001). The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3416–3421.

- Foveau, B., Leroy, C., Ancot, F., Deheuninck, J., Ji, Z., Fafeur, V., and Tulasne, D. (2006). Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ.* *14*, 752–764.
- Foveau, B., Ancot, F., Leroy, C., Petrelli, A., Reiss, K., Vingtdeux, 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*, 2495–2507.
- Francis, R.J., Kotecha, S., and Hallett, M.B. (2013). Ca²⁺ activation of cytosolic calpain induces the transition from apoptosis to necrosis in neutrophils with externalized phosphatidylserine. *J. Leukoc. Biol.* *93*, 95–100.
- Franco, S., Perrin, B., and Huttenlocher, A. (2004a). Isoform specific function of calpain 2 in regulating membrane protrusion. *Exp. Cell Res.* *299*, 179–187.
- Franco, S.J., Rodgers, M.A., Perrin, B.J., Han, J., Bennin, D.A., Critchley, D.R., and Huttenlocher, A. (2004b). Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat. Cell Biol.* *6*, 977–983.
- Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.* *30*, 193–204.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 362–374.
- Fu, L., Guo, W., Liu, B., Sun, L., Bi, Z., Zhu, L., Wang, X., Liu, B., Xie, Q., and Li, K. (2013). Shedding of c-Met ectodomain correlates with c-Met expression in non-small cell lung cancer. *Biomarkers* *18*, 126–135.
- Furla, A., and Tulasne, D. (2014). How does met regulate the survival/apoptosis balance? *Hepatol. Baltim. Md* *60*, 1108–1109.
- Galichet, A., Weibel, M., and Heizmann, C.W. (2008). Calcium-regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *370*, 1–5.
- Gallardo, E., Saenz, A., and Illa, I. (2011). Limb-girdle muscular dystrophy 2A. *Handb. Clin. Neurol.* *101*, 97–110.
- 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*, 8498–8508.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* *19*, 107–120.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Krautwald, S., Kroemer, G., and Linkermann, A. (2014). Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Semin. Cell Dev. Biol.*
- 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., Andž, M., Stella, M.C., and Comoglio, P.M. (1996). Ets up-regulates MET transcription. *Oncogene* *13*, 1911–1917.
- Gandino, L., Longati, P., Medico, E., Prat, M., and Comoglio, P.M. (1994). Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *J. Biol. Chem.* *269*, 1815–1820.
- Gao, G., and Dou, Q.P. (2000). N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J. Cell. Biochem.* *80*, 53–72.
- 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., et al. (2007). Overexpression of c-Met and of the transducers PI3K, FAK and JAK in breast carcinomas correlates with shorter survival and neoangiogenesis. *Int. J. Oncol.*
- Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Inserte, J., Rodriguez-Sinovas, A., and Piper, H.M. (2012). Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc. Res.* *94*, 168–180.
- Garcia-Guzman, M., Dolfi, F., Zeh, K., and Vuori, K. (1999). Met-induced JNK activation is mediated by the adapter protein Crk and correlates with the Gab1 - Crk signaling complex formation. *Oncogene* *18*, 7775–7786.
- Ghamari, A., van de Corput, M.P.C., Thongjuea, S., van Cappellen, W.A., van Ijcken, W., van Haren, J., Soler, E., Eick, D., Lenhard, B., and Grosveld, F.G. (2013). In vivo live imaging of RNA polymerase II transcription factories in primary cells. *Genes Dev.* *27*, 767–777.
- Gherardi, E., Youles, M.E., Miguel, R.N., Blundell, T.L., Iamelle, L., Gough, J., Bandyopadhyay, A., Hartmann, G., and Butler, P.J. (2003). Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12039–12044.
- Gherardi, E., Love, C.A., Esnouf, R.M., and Jones, E.Y. (2004). The sema domain. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *14*, 669–678.
- 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., et al. (2006). Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. *Proc Natl Acad Sci U A* *103*, 4046–4051.
- Gherardi, E., Birchmeier, W., Birchmeier, C., and Woude, G.V. (2012a). Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer* *12*, 89–103.
- Gherardi, E., Birchmeier, W., Birchmeier, C., and Vande Woude, G. (2012b). Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 89–103.
- Ghousoub, 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*, 1513–1520.

- 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.
- 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, 720–724.
- Glading, A., Ueberall, F., Keyse, S.M., Lauffenburger, D.A., and Wells, A. (2001). Membrane proximal ERK signaling is required for M-calpain activation downstream of epidermal growth factor receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 23341–23348.
- Goldoni, S., Humphries, A., Nyström, 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, 743–754.
- Goldschneider, D., and Mehlen, P. (2010). Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* 29, 1865–1882.
- 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, 17198–17203.
- Graveel, C.R., DeGroot, J.D., Su, Y., Koeman, J., Dykema, K., Leung, S., Snider, J., Davies, S.R., Swiatek, P.J., Cottingham, S., et al. (2009). Met induces diverse mammary carcinomas in mice and is associated with human basal breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12909–12914.
- Greenhough, A., Smartt, H.J.M., Moore, A.E., Roberts, H.R., Williams, A.C., Paraskeva, C., and Kaidi, A. (2009). The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 30, 377–386.
- Gu, Y., Zhang, H., Su, D., Mo, M., Song, P., Zhang, F., and Zhang, S. (2013). miR-30b and miR-30c expression predicted response to tyrosine kinase inhibitors as first line treatment in non-small cell lung cancer. *Chin. Med. J. (Engl.)* 126, 4435–4439.
- 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, 1509–1518.
- Guenebeaud, C., Goldschneider, D., Castets, M., Guix, C., Chazot, G., Delloye-Bourgeois, C., Eisenberg-Lerner, A., Shohat, G., Zhang, M., Laudet, V., et al. (2010). The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. *Mol. Cell* 40, 863–876.
- Gujral, J.S., Knight, T.R., Farhood, A., Bajt, M.L., and Jaeschke, H. (2002). Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 67, 322–328.
- Guo, A., Villén, J., Kornhauser, J., Lee, K.A., Stokes, M.P., Rikova, K., Possemato, A., Nardone, J., Innocenti, G., Wetzel, R., et al. (2008). Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 692–697.
- Guroff, G. (1964). A NEUTRAL, CALCIUM-ACTIVATED PROTEINASE FROM THE SOLUBLE FRACTION OF RAT BRAIN. *J. Biol. Chem.* 239, 149–155.
- Ha, S.Y., Lee, J., Jang, J., Hong, J.Y., Do, I.-G., Park, S.H., Park, J.O., Choi, M.-G., Sohn, T.S., Bae, J.M., et al. (2014). HER2-positive gastric cancer with concomitant MET and/or EGFR overexpression: A distinct subset of patients for dual inhibition therapy. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer.*
- Halestrap, A.P. (2010). A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 841–860.
- Halestrap, A.P., and Richardson, A.P. The mitochondrial permeability transition: A current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.*
- Hammond, D.E., Urbé, S., Vande Woude, G.F., and Clague, M.J. (2001). Down-regulation of MET, the receptor for hepatocyte growth factor. *Oncogene* 20, 2761–2770.
- Han, Y., Weinman, S., Boldogh, I., Walker, R.K., and Brasier, A.R. (1999). Tumor necrosis factor-alpha-inducible I kappa Balpha proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for nuclear factor-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 274, 787–794.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hasenauer, S., Malinge, D., Koschut, D., Pace, G., Matzke, A., von Au, A., and Orian-Rousseau, V. (2013). Internalization of Met requires the co-receptor CD44v6 and its link to ERM proteins. *PloS One* 8, e62357.
- Hashigasako, A., Machide, M., Nakamura, T., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (2004). Bi-directional regulation of Ser-985 phosphorylation of c-met via protein kinase C and protein phosphatase 2A involves c-Met activation and cellular responsiveness to hepatocyte growth factor. *J. Biol. Chem.* 279, 26445–26452.
- Hell, J.W., Westenbroek, R.E., Breeze, L.J., Wang, K.K., Chavkin, C., and Catterall, W.A. (1996). N-methyl-D-aspartate receptor-induced proteolytic conversion of postsynaptic class C L-type calcium channels in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 3362–3367.
- 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, 222–227.
- Higuchi, O., Mizuno, K., Vande Woude, G.F., and Nakamura, T. (1992). Expression of c-met proto-oncogene in COS cells induces the signal transducing high-affinity receptor for hepatocyte growth factor. *FEBS Lett.* 301, 282–286.
- Hinson, J.A., Roberts, D.W., and James, L.P. (2010). Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb. Exp. Pharmacol.* 369–405.

- Honda, S., Marumoto, T., Hirota, T., Nitta, M., Arima, Y., Ogawa, M., and Saya, H. (2004). Activation of m-calpain is required for chromosome alignment on the metaphase plate during mitosis. *J. Biol. Chem.* 279, 10615–10623.
- Hong, D.S., LoRusso, P., Hamid, O., Beupre, D.M., Janku, F., Khan, R., Kittaneh, M., Loberg, R.D., Amore, B., Caudillo, I., et al. (2014). First-in-human study of AMG 337, a highly selective oral inhibitor of MET, in adult patients (pts) with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 32:5s.
- Hori, K., Sen, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2013). Notch signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 2135–2140.
- Hosfield, C.M., Elce, J.S., Davies, P.L., and Jia, Z. (1999). Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca²⁺-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J.* 18, 6880–6889.
- Hou, S.T., Jiang, S.X., Desbois, A., Huang, D., Kelly, J., Tessier, L., Karchewski, L., and Kappler, J. (2006). Calpain-cleaved collapsin response mediator protein-3 induces neuronal death after glutamate toxicity and cerebral ischemia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 2241–2249.
- Hou, S.T., Jiang, S.X., Aylsworth, A., Cooke, M., and Zhou, L. (2013). Collapsin response mediator protein 3 deacetylates histone H4 to mediate nuclear condensation and neuronal death. *Sci. Rep.* 3, 1350.
- Huang, F., Huang, M., Zhang, H., Guo, B., Zhang, D., and Zhou, G. (2014). Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during postmortem ageing of beef skeletal muscle. *Food Chem.* 148, 1–6.
- Huang, P.H., Mukasa, A., Bonavia, R., Flynn, R.A., Brewer, Z.E., Cavenee, W.K., Furnari, F.B., and White, F.M. (2007). Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 12867–12872.
- Huh, C.-G., Factor, V.M., Sánchez, 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, 4477–4482.
- Huttenlocher, A., Palecek, S.P., Lu, Q., Zhang, W., Mellgren, R.L., Lauffenburger, D.A., Ginsberg, M.H., and Horwitz, A.F. (1997). Regulation of Cell Migration by the Calcium-dependent Protease Calpain. *J. Biol. Chem.* 272, 32719–32722.
- Hwang, C.-I., Matoso, A., Corney, D.C., Flesken-Nikitin, A., Körner, S., Wang, W., Boccaccio, C., Thorgeirsson, S.S., Comoglio, P.M., Hermeking, H., et al. (2011). Wild-type p53 controls cell motility and invasion by dual regulation of MET expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14240–14245.
- Ichim, G., Genevois, A.-L., Ménard, M., Yu, L.-Y., Coelho-Aguiar, J.M., Llambi, F., Jarrosson-Wuilleme, L., Lefebvre, J., Tulasne, D., Dupin, E., et al. (2013). The dependence receptor TrkC triggers mitochondria-dependent apoptosis upon Cobra-1 recruitment. *Mol. Cell* 51, 632–646.
- Ido, A., Moriuchi, A., Numata, M., Murayama, T., Teramukai, S., Marusawa, H., Yamaji, N., Setoyama, H., Kim, I.-D., Chiba, T., et al. (2011). Safety and pharmacokinetics of recombinant human hepatocyte growth factor (rh-HGF) in patients with fulminant hepatitis: a phase I/II clinical trial, following preclinical studies to ensure safety. *J. Transl. Med.* 9, 55.
- Igawa, T., Matsumoto, K., Kanda, S., Saito, Y., and Nakamura, T. (1993). Hepatocyte growth factor may function as a renotropic factor for regeneration in rats with acute renal injury. *Am. J. Physiol.* 265, F61–F69.
- Imajoh, S., Kawasaki, H., and Suzuki, K. (1986). Limited autolysis of calcium-activated neutral protease (CANP): reduction of the Ca²⁺-requirement is due to the NH₂-terminal processing of the large subunit. *J. Biochem. (Tokyo)* 100, 633–642.
- Imajoh, S., Kawasaki, H., and Suzuki, K. (1987). The COOH-terminal E-F hand structure of calcium-activated neutral protease (CANP) is important for the association of subunits and resulting proteolytic activity. *J. Biochem. (Tokyo)* 101, 447–452.
- Imielinski, M., Berger, A.H., Hammerman, P.S., Hernandez, B., Pugh, T.J., Hodis, E., Cho, J., Suh, J., Capelletti, M., Sivachenko, A., et al. (2012). Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell* 150, 1107–1120.
- Inomata, M., Hayashi, M., Nakamura, M., Imahori, K., and Kawashima, S. (1983). Purification and characterization of a calcium-activated neutral protease from rabbit skeletal muscle which requires calcium ions of microM order concentration. *J. Biochem. (Tokyo)* 93, 291–294.
- Ishibe, S., Karihaloo, A., Ma, H., Zhang, J., Marlier, A., Mitobe, M., Togawa, A., Schmitt, R., Czyczk, J., Kashgarian, M., et al. (2009). Met and the epidermal growth factor receptor act cooperatively to regulate final nephron number and maintain collecting duct morphology. *Dev. Camb. Engl.* 136, 337–345.
- 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.
- Jagadeeswaran, R., Ma, P.C., Seiwert, T.Y., Jagadeeswaran, S., Zumba, O., Nallasura, V., Ahmed, S., Filiberti, R., Paganuzzi, M., Puntoni, R., et al. (2006). Functional analysis of c-Met/hepatocyte growth factor pathway in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res.* 66, 352–361.
- Jakubczak, J.L., LaRochelle, W.J., and Merlino, G. (1998). NK1, a natural splice variant of hepatocyte growth factor/scatter factor, is a partial agonist in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1275–1283.
- Janjigian, Y.Y., Tang, L.H., Coit, D.G., Kelsen, D.P., Francone, T.D., Weiser, M.R., Jhanwar, S.C., and Shah, M.A. (2011). MET expression and amplification in patients with localized gastric cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 20, 1021–1027.
- Janssen, K., Horn, S., Niemann, M.T., Daniel, P.T., Schulze-Osthoff, K., and Fischer, U. (2009). Inhibition of the ER Ca²⁺ pump forces multidrug-resistant cells deficient in Bak and Bax into necrosis. *J. Cell Sci.* 122, 4481–4491.

- 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*, 11445–11450.
- Jiang, W.G., Hiscox, S.E., Parr, C., Martin, T.A., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Mansel, R.E. (1999). Antagonistic effect of NK4, a novel hepatocyte growth factor variant, on in vitro angiogenesis of human vascular endothelial cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *5*, 3695–3703.
- 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*, 654–660.
- Jin, H., Yang, R., Zheng, Z., Romero, M., Ross, J., Bou-Reslan, H., Carano, R.A.D., Kasman, I., Mai, E., Young, J., et al. (2008). MetMAB, the one-armed 5D5 anti-c-Met antibody, inhibits orthotopic pancreatic tumor growth and improves survival. *Cancer Res.* *68*, 4360–4368.
- 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*, 8806–8811.
- Joffre, C., Barrow, R., Ménard, L., Calleja, V., Hart, I.R., and Kermorgant, S. (2011). A direct role for Met endocytosis in tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* *13*, 827–837.
- Jones, D.S., Tsai, P.-C., and Cochran, J.R. (2011). Engineering hepatocyte growth factor fragments with high stability and activity as Met receptor agonists and antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 13035–13040.
- Jun, H.J., Acquaviva, J., Chi, D., Lessard, J., Zhu, H., Woolfenden, S., Bronson, R.T., Pfannl, R., White, F., Housman, D.E., et al. (2012). Acquired MET expression confers resistance to EGFR inhibition in a mouse model of glioblastoma multiforme. *Oncogene* *31*, 3039–3050.
- Jun, H.T., Sun, J., Rex, K., Radinsky, R., Kendall, R., Coxon, A., and Burgess, T.L. (2007). AMG 102, a fully human anti-hepatocyte growth factor/scatter factor neutralizing antibody, enhances the efficacy of temozolomide or docetaxel in U-87 MG cells and xenografts. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 6735–6742.
- Jung, W., Castren, E., Odenthal, M., Vande Woude, G.F., Ishii, T., Dienes, H.P., Lindholm, D., and Schirmacher, P. (1994). Expression and functional interaction of hepatocyte growth factor-scatter factor and its receptor c-met in mammalian brain. *J. Cell Biol.* *126*, 485–494.
- 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*, 4357–4361.
- Kawakami, H., Okamoto, I., Arao, T., Okamoto, W., Matsumoto, K., Taniguchi, H., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Nishio, K., Nakagawa, K., et al. (2013). MET amplification as a potential therapeutic target in gastric cancer. *Oncotarget* *4*, 9–17.
- Kawakami, H., Okamoto, I., Okamoto, W., Tanizaki, J., Nakagawa, K., and Nishio, K. (2014). Targeting MET Amplification as a New Oncogenic Driver. *Cancers* *6*, 1540–1552.
- Kelly, B.L., Vassar, R., and Ferreira, A. (2005). Beta-amyloid-induced dynamin 1 depletion in hippocampal neurons. A potential mechanism for early cognitive decline in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* *280*, 31746–31753.
- Kermorgant, S., and Parker, P.J. (2005). c-Met signalling: spatio-temporal decisions. *Cell Cycle Georget. Tex* *4*, 352–355.
- 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*, 28921–28929.
- Kermorgant, S., Zicha, D., and Parker, P.J. (2004). PKC controls HGF-dependent c-Met traffic, signalling and cell migration. *EMBO J.* *23*, 3721–3734.
- 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*, 239–257.
- Khoury, H., Naujokas, M.A., Zuo, D., Sangwan, V., Frigault, M.M., Petkiewicz, S., Dankort, D.L., Muller, W.J., and Park, M. (2005). HGF converts ErbB2/Neu epithelial morphogenesis to cell invasion. *Mol. Biol. Cell* *16*, 550–561.
- Kim, W.-H., Matsumoto, K., Bessho, K., and Nakamura, T. (2005). Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis. *Am. J. Pathol.* *166*, 1017–1028.
- Kimura, Y., Saya, H., and Nakao, M. (2000). Calpain-dependent proteolysis of NF2 protein: involvement in schwannomas and meningiomas. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* *20*, 153–160.
- Kirchhofer, D., Lipari, M.T., Santell, L., Billeci, K.L., Maun, H.R., Sandoval, W.N., Moran, P., Ridgway, J., Eigenbrot, C., and Lazarus, R.A. (2007). Utilizing the activation mechanism of serine proteases to engineer hepatocyte growth factor into a Met antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 5306–5311.
- Kling, A., Mack, H., Jantos, K., Moeller, A., Hornberger, W., and Hutchins, C. (2010). Carboxamide Compounds and Their Use as Calpain Inhibitors.
- Klingelhutz, A.J., Smith, P.P., Garrett, L.R., and McDougall, J.K. (1993). Alteration of the DCC tumor-suppressor gene in tumorigenic HPV-18 immortalized human keratinocytes transformed by nitrosomethylurea. *Oncogene* *8*, 95–99.
- Kobayashi, T., Honke, K., Miyazaki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ishizuka, I., and Makita, A. (1994). Hepatocyte growth factor specifically binds to sulfoglycolipids. *J. Biol. Chem.* *269*, 9817–9821.

- Koeppen, H., Yu, W., Zha, J., Pandita, A., Penuel, E., Rangell, L., Raja, R., Mohan, S., Patel, R., Desai, R., et al. (2014). Biomarker Analyses from a Placebo-Controlled Phase II Study Evaluating Erlotinib {+/-} Onartuzumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: MET Expression Levels Are Predictive of Patient Benefit. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*
- 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*, 6213–6221.
- 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*, 25–29.
- 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.
- Kong-Beltran, M., Seshagiri, S., Zha, J., Zhu, W., Bhawe, K., Mendoza, N., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Fu, L., et al. (2006). Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer Res.* *66*, 283–289.
- Korhan, P., Erdal, E., and Atabay, N. (2014). miR-181a-5p is downregulated in hepatocellular carcinoma and suppresses motility, invasion and branching-morphogenesis by directly targeting c-Met. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- Kosai, K., Matsumoto, K., Nagata, S., Tsujimoto, Y., and Nakamura, T. (1998). Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *244*, 683–690.
- 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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 5714–5723.
- Kulkarni, S., Saido, T.C., Suzuki, K., and Fox, J.E. (1999). Calpain mediates integrin-induced signaling at a point upstream of Rho family members. *J. Biol. Chem.* *274*, 21265–21275.
- Kulkarni, S., Reddy, K.B., Esteva, F.J., Moore, H.C.F., Budd, G.T., and Tubbs, R.R. (2010). Calpain regulates sensitivity to trastuzumab and survival in HER2-positive breast cancer. *Oncogene* *29*, 1339–1350.
- Kulkarni, S., Saju, L., Farver, C., and Tubbs, R. (2012). Calpain4 is required for activation of HER2 in breast cancer cells exposed to trastuzumab and its suppression decreases survival and enhances response. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *131*, 2420–2432.
- Lai, A.Z., Cory, S., Zhao, H., Gigoux, M., Monast, A., Guiot, M.-C., Huang, S., Tofigh, A., Thompson, C., Naujokas, M., et al. (2014a). Dynamic reprogramming of signaling upon met inhibition reveals a mechanism of drug resistance in gastric cancer. *Sci. Signal.* *7*, ra38.
- Lai, T.W., Zhang, S., and Wang, Y.T. (2014b). Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* *115*, 157–188.
- Lamballe, F., Genestine, M., Caruso, N., Arce, V., Richelme, S., Helmbacher, F., and Maina, F. (2011). Pool-Specific Regulation of Motor Neuron Survival by Neurotrophic Support. *J. Neurosci.* *31*, 11144–11158.
- Lamond, A.I., and Spector, D.L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 605–612.
- Landgraf, K.E., Steffek, M., Quan, C., Tom, J., Yu, C., Santell, L., Maun, H.R., Eigenbrot, C., and Lazarus, R.A. (2014). An allosteric switch for pro-HGF/Met signaling using zymogen activator peptides. *Nat. Chem. Biol.* *10*, 567–573.
- Lee, J., Seo, J.W., Jun, H.J., Ki, C.-S., Park, S.H., Park, Y.S., Lim, H.Y., Choi, M.G., Bae, J.M., Sohn, T.S., et al. (2011). Impact of MET amplification on gastric cancer: possible roles as a novel prognostic marker and a potential therapeutic target. *Oncol. Rep.* *25*, 1517–1524.
- 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*, 4947–4953.
- Lefebvre, J., Ancot, F., Leroy, C., Muharram, G., Lemièrre, A., and Tulasne, D. (2012). Met degradation: more than one stone to shoot a receptor down. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *26*, 1387–1399.
- Lefebvre, J., Muharram, G., Leroy, C., Kherrouche, Z., Montagne, R., Ichim, G., Tauszig-Delamasure, S., Chotteau-Lelievre, A., Brenner, C., Mehlen, P., et al. (2013). Caspase-generated fragment of the Met receptor favors apoptosis via the intrinsic pathway independently of its tyrosine kinase activity. *Cell Death Dis.* *4*, e871.
- Leloup, L., and Wells, A. (2011). Calpains as potential anti-cancer targets. *Expert Opin. Ther. Targets* *15*, 309–323.
- Levy, D.E., and Darnell, J.E. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 651–662.
- 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*, 85–88.
- Li, N., Xiang, G.-S., Dokainish, H., Ireton, K., and Elferink, L.A. (2005). The Listeria protein internalin B mimics hepatocyte growth factor-induced receptor trafficking. *Traffic Cph. Den.* *6*, 459–473.
- Limaye, P.B., Apte, U.M., Shankar, K., Bucci, T.J., Warbritton, A., and Mehendale, H.M. (2003). Calpain released from dying hepatocytes mediates progression of acute liver injury induced by model hepatotoxicants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *191*, 211–226.
- Limaye, P.B., Bhave, V.S., Palkar, P.S., Apte, U.M., Sawant, S.P., Yu, S., Latendresse, J.R., Reddy, J.K., and Mehendale, H.M. (2006). Upregulation of calpastatin in regenerating and developing rat liver: role in resistance against hepatotoxicity. *Hepatol. Baltim. Md* *44*, 379–388.

- 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, 833–842.
- Linker, C., Lesbros, C., Gros, J., Burrus, L.W., Rawls, A., and Marcelle, C. (2005). beta-Catenin-dependent Wnt signalling controls the epithelial organisation of somites through the activation of paraxis. *Dev. Camb. Engl.* 132, 3895–3905.
- Liu, F., Schaphorst, K.L., Verin, A.D., Jacobs, K., Birukova, A., Day, R.M., Bogatcheva, N., Bottaro, D.P., and Garcia, J.G.N. (2002a). Hepatocyte growth factor enhances endothelial cell barrier function and cortical cytoskeletal rearrangement: potential role of glycogen synthase kinase-3beta. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 950–962.
- Liu, L., Xing, D., Chen, W.R., Chen, T., Pei, Y., and Gao, X. (2008). Calpain-mediated pathway dominates cisplatin-induced apoptosis in human lung adenocarcinoma cells as determined by real-time single cell analysis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 122, 2210–2222.
- Liu, L., Xing, D., and Chen, W.R. (2009a). Micro-calpain regulates caspase-dependent and apoptosis inducing factor-mediated caspase-independent apoptotic pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 125, 2757–2766.
- Liu, Y., Chattopadhyay, N., Qin, S., Szekeres, C., Vasylyeva, T., Mahoney, Z.X., Taglienti, M., Bates, C.M., Chapman, H.A., Miner, J.H., et al. (2009b). Coordinate integrin and c-Met signaling regulate Wnt gene expression during epithelial morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 136, 843–853.
- Liu, Y., Zhang, Q., Ren, C., Ding, Y., Jin, G., Hu, Z., Xu, Y., and Shen, H. (2012). A germline variant N375S in MET and gastric cancer susceptibility in a Chinese population. *J. Biomed. Res.* 26, 315–318.
- Liu, Z.-X., Yu, C.F., Nickel, C., Thomas, S., and Cantley, L.G. (2002b). Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. *J. Biol. Chem.* 277, 10452–10458.
- Llambi, F., Lourenço, F.C., Gozuacik, D., Guix, C., Pays, L., Del Rio, G., Kimchi, A., and Mehlen, P. (2005). The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *EMBO J.* 24, 1192–1201.
- 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, 31536–31545.
- 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, 30083–30090.
- Loges, S., Mazzone, M., Hohensinner, P., and Carmeliet, P. (2009). Silencing or Fueling Metastasis with VEGF Inhibitors: Antiangiogenesis Revisited. *Cancer Cell* 15, 167–170.
- 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, 2503–2510.
- Lokker, N.A., Presta, L.G., and Godowski, P.J. (1994). Mutational analysis and molecular modeling of the N-terminal kringle-containing domain of hepatocyte growth factor identifies amino acid side chains important for interaction with the c-Met receptor. *Protein Eng.* 7, 895–903.
- 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.
- Longati, P., Albero, D., and Comoglio, P.M. (1996). Hepatocyte growth factor is a pleiotropic factor protecting epithelial cells from apoptosis. *Cell Death Differ.* 3, 23–28.
- Luchino, J., Hocine, M., Amoureux, M.-C., Gibert, B., Bernet, A., Royet, A., Treilleux, I., Lécine, P., Borg, J.-P., Mehlen, P., et al. (2013). Semaphorin 3E suppresses tumor cell death triggered by the plexin D1 dependence receptor in metastatic breast cancers. *Cancer Cell* 24, 673–685.
- Lüthi, A.U., and Martin, S.J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 14, 641–650.
- 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, 11216–11223.
- Lytton, J., Westlin, M., and Hanley, M.R. (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* 266, 17067–17071.
- Ma, H., Saenko, M., Opuko, A., Togawa, A., Soda, K., Marlier, A., Moeckel, G.W., Cantley, L.G., and Ishibe, S. (2009a). Deletion of the Met receptor in the collecting duct decreases renal repair following ureteral obstruction. *Kidney Int.* 76, 868–876.
- Ma, H., Saenko, M., Opuko, A., Togawa, A., Soda, K., Marlier, A., Moeckel, G.W., Cantley, L.G., and Ishibe, S. (2009b). Deletion of the Met receptor in the collecting duct decreases renal repair following ureteral obstruction. *Kidney Int.* 76, 868–876.
- Ma, J., Zou, C., Guo, L., Seneviratne, D.S., Tan, X., Kwon, Y.-K., An, J., Bowser, R., DeFrances, M.C., and Zarnegar, R. (2014). Novel Death Defying Domain in Met entraps the active site of caspase-3 and blocks apoptosis in hepatocytes. *Hepatology* 59, 2010–2021.
- 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, 6272–6281.

- 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, 1479–1488.
- Ma, P.C., Tretiakova, M.S., MacKinnon, A.C., Ramnath, N., Johnson, C., Dietrich, S., Seiwert, T., Christensen, J.G., Jagadeeswaran, R., Krausz, T., et al. (2008). Expression and mutational analysis of MET in human solid cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 1025–1037.
- Maggiora, P., Lorenzato, A., Fracchioli, S., Costa, B., Castagnaro, M., Arisio, R., Katsaros, D., Massobrio, M., Comoglio, P.M., and Flavia Di Renzo, M. (2003). The RON and MET oncogenes are co-expressed in human ovarian carcinomas and cooperate in activating invasiveness. *Exp. Cell Res.* 288, 382–389.
- Maina, F., and Klein, R. (1999a). Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nat. Neurosci.* 2, 213–217.
- Maina, F., and Klein, R. (1999b). Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nat. Neurosci.* 2, 213–217.
- 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, 531–542.
- 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.
- Maina, F., Panté, 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, 1293–1306.
- Mamoune, A., Luo, J.-H., Lauffenburger, D.A., and Wells, A. (2003). Calpain-2 as a target for limiting prostate cancer invasion. *Cancer Res.* 63, 4632–4640.
- Mancini, M., Leo, E., Campi, V., Castagnetti, F., Zazzeroni, L., Gugliotta, G., Santucci, M.A., and Martinelli, G. (2014). A calpain-cleaved fragment of β -catenin promotes BCRABL1+ cell survival evoked by autophagy induction in response to imatinib. *Cell. Signal.* 26, 1690–1697.
- Mao, Y.S., Zhang, B., and Spector, D.L. (2011). Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet. TIG* 27, 295–306.
- Maroun, C.R., Naujokas, M.A., Holgado-Madruga, M., Wong, A.J., and Park, M. (2000). The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8513–8525.
- 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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 6144–6152.
- Martin, V., Corso, S., Comoglio, P.M., and Giordano, S. (2014). Increase of MET gene copy number confers resistance to a monovalent MET antibody and establishes drug dependence. *Mol. Oncol.*
- Martinez, J.A., Zhang, Z., Svetlov, S.I., Hayes, R.L., Wang, K.K., and Larner, S.F. (2010). Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 15, 1480–1493.
- Martins, G.J., Shahrokh, M., and Powell, E.M. (2011). Genetic disruption of Met signaling impairs GABAergic striatal development and cognition. *Neuroscience* 176, 199–209.
- Mason, S., Hader, C., Marlier, A., Moeckel, G., and Cantley, L.G. (2014). Met activation is required for early cytoprotection after ischemic kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 25, 329–337.
- Matsubara, D., Ishikawa, S., Oguni, S., Aburatani, H., Fukayama, M., and Niki, T. (2010). Molecular predictors of sensitivity to the MET inhibitor PHA665752 in lung carcinoma cells. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 5, 1317–1324.
- Matsumoto, K., and Nakamura, T. (2006). Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 119, 477–483.
- Matteucci, E., Castoldi, R., and Desiderio, M.A. (2001). Hepatocyte growth factor induces pro-apoptotic genes in HepG2 hepatoma but not in B16-F1 melanoma cells. *J. Cell. Physiol.* 186, 387–396.
- Matteucci, E., Bendinelli, P., and Desiderio, M.A. (2009). Nuclear localization of active HGF receptor Met in aggressive MDA-MB231 breast carcinoma cells. *Carcinogenesis* 30, 937–945.
- 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, 8797–8806.
- 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.
- 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, 1418–1432.
- McCollum, A.T., Nasr, P., and Estus, S. (2002). Calpain activates caspase-3 during UV-induced neuronal death but only calpain is necessary for death. *J. Neurochem.* 82, 1208–1220.
- McDermott, U., Sharma, S.V., Dowell, L., Greninger, P., Montagut, C., Lamb, J., Archibald, H., Raudales, R., Tam, A., Lee, D., et al. (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, 19936–19941.

- McDermott, U., Pusapati, R.V., Christensen, J.G., Gray, N.S., and Settleman, J. (2010). Acquired resistance of non-small cell lung cancer cells to MET kinase inhibition is mediated by a switch to epidermal growth factor receptor dependency. *Cancer Res.* *70*, 1625–1634.
- Mehlen, P., and Fearon, E.R. (2004). Role of the Dependence Receptor DCC in Colorectal Cancer Pathogenesis. *J. Clin. Oncol.* *22*, 3420–3428.
- Mehlen, P., Rabizadeh, S., Snipas, S.J., Assa-Munt, N., Salvesen, G.S., and Bredesen, D.E. (1998). The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* *395*, 801–804.
- Mellgren, R.L. (1980). Canine cardiac calcium-dependent proteases: Resolution of two forms with different requirements for calcium. *FEBS Lett.* *109*, 129–133.
- Ménard, L., Parker, P.J., and Kermorgant, S. (2014). Receptor tyrosine kinase c-Met controls the cytoskeleton from different endosomes via different pathways. *Nat. Commun.* *5*, 3907.
- Mendelson, K., Swendeman, S., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2010). Stimulation of platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFRbeta) activates ADAM17 and promotes metalloproteinase-dependent cross-talk between the PDGFRbeta and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways. *J. Biol. Chem.* *285*, 25024–25032.
- Mezyk-Kopeć, R., Bzowska, M., Stalińska, K., Chelmiecki, T., Podkalicki, M., Jucha, J., Kowalczyk, K., Mak, P., and Bereta, J. (2009). Identification of ADAM10 as a major TNF sheddase in ADAM17-deficient fibroblasts. *Cytokine* *46*, 309–315.
- Michalopoulos, G.K., and DeFrances, M.C. (1997). Liver regeneration. *Science* *276*, 60–66.
- 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*, 10128–10136.
- Mille, F., Thibert, C., Fombonne, J., Rama, N., Guix, C., Hayashi, H., Corset, V., Reed, J.C., and Mehlen, P. (2009). The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. *Nat. Cell Biol.* *11*, 739–746.
- Minobe, E., Hao, L.-Y., Saud, Z.A., Xu, J.-J., Kameyama, A., Maki, M., Jewell, K.K., Parr, T., Bardsley, R.G., and Kameyama, M. (2006). A region of calpastatin domain L that reprimers cardiac L-type Ca²⁺ channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *348*, 288–294.
- Minuti, G., Cappuzzo, F., Duchnowska, R., Jassem, J., Fabi, A., O'Brien, T., Mendoza, A.D., Landi, L., Biernat, W., Czartoryska-Arlukowicz, B., et al. (2012). Increased MET and HGF gene copy numbers are associated with trastuzumab failure in HER2-positive metastatic breast cancer. *Br. J. Cancer* *107*, 793–799.
- Mitamura, T., Watari, H., Wang, L., Kanno, H., Hassan, M.K., Miyazaki, M., Katoh, Y., Kimura, T., Tanino, M., Nishihara, H., et al. (2013). Downregulation of miRNA-31 induces taxane resistance in ovarian cancer cells through increase of receptor tyrosine kinase MET. *Oncogenesis* *2*, e40.
- Mitra, A.K., Sawada, K., Tiwari, P., Mui, K., Gwin, K., and Lengyel, E. (2011). Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and $\alpha(5)\beta(1)$ -integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene* *30*, 1566–1576.
- Miyazawa, K., Kitamura, A., Naka, D., and Kitamura, N. (1991). An alternatively processed mRNA generated from human hepatocyte growth factor gene. *Eur. J. Biochem. FEBS* *197*, 15–22.
- Mizuno, S., and Nakamura, T. (2013). HGF-MET Cascade, a Key Target for Inhibiting Cancer Metastasis: The Impact of NK4 Discovery on Cancer Biology and Therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 888–919.
- Mizuno, S., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (2008). HGF as a renoprotective and anti-fibrotic regulator in chronic renal disease. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *13*, 7072–7086.
- Moldoveanu, T., Hosfield, C.M., Lim, D., Elce, J.S., Jia, Z., and Davies, P.L. (2002). A Ca²⁺ switch aligns the active site of calpain. *Cell* *108*, 649–660.
- Moldoveanu, T., Jia, Z., and Davies, P.L. (2004). Calpain activation by cooperative Ca²⁺ binding at two non-EF-hand sites. *J. Biol. Chem.* *279*, 6106–6114.
- Montagne, R., Furlan, A., Kherrouche, Z., and Tulasne, D. (2014). [Thirty years of Met receptor research: from the discovery of an oncogene to the development of targeted therapies]. *Médecine Sci. MS* *30*, 864–873.
- Montesano, R., Schaller, G., and Orci, L. (1991). Induction of epithelial tubular morphogenesis in vitro by fibroblast-derived soluble factors. *Cell* *66*, 697–711.
- 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.
- Morciano, G., Giorgi, C., Bonora, M., Punzetti, S., Pavasini, R., Wieckowski, M.R., Campo, G., and Pinton, P. Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.*
- Moretti, D., Del Bello, B., Allavena, G., and Maellaro, E. (2014). Calpains and cancer: Friends or enemies? *Arch. Biochem. Biophys.*
- Morgan, A.J., and Jacob, R. (1994). Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem. J.* *300 (Pt 3)*, 665–672.
- Morishita, R., Nakamura, S., Hayashi, S., Taniyama, Y., Moriguchi, A., Nagano, T., Taiji, M., Noguchi, H., Takeshita, S., Matsumoto, K., et al. (1999). Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension* *33*, 1379–1384.

- Morotti, A., Mila, S., Accornero, P., Tagliabue, E., and Ponzetto, C. (2002). K252a inhibits the oncogenic properties of Met, the HGF receptor. *Oncogene* 21, 4885–4893.
- Moshitch-Moshkovitz, S., Tsarfaty, G., Kaufman, D.W., Stein, G.Y., Shichrur, K., Solomon, E., Sigler, R.H., Resau, J.H., Vande Woude, G.F., and Tsarfaty, I. (2006). In vivo direct molecular imaging of early tumorigenesis and malignant progression induced by transgenic expression of GFP-Met. *Neoplasia* N. Y. N 8, 353–363.
- Moubarak, R.S., Yuste, V.J., Artus, C., Bouharrour, A., Greer, P.A., Menissier-de Murcia, J., and Susin, S.A. (2007). Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4844–4862.
- Mueller, K.L., Hunter, L.A., Ethier, S.P., and Boerner, J.L. (2008). Met and c-Src cooperate to compensate for loss of epidermal growth factor receptor kinase activity in breast cancer cells. *Cancer Res.* 68, 3314–3322.
- Mueller, K.L., Yang, Z.-Q., Haddad, R., Ethier, S.P., and Boerner, J.L. (2010). EGFR/Met association regulates EGFR TKI resistance in breast cancer. *J. Mol. Signal.* 5, 8.
- Muharram, G., Sahgal, P., Korpela, T., De Franceschi, N., Kaukonen, R., Clark, K., Tulasne, D., Carpén, O., and Ivaska, J. (2014). Tensin-4-dependent MET stabilization is essential for survival and proliferation in carcinoma cells. *Dev. Cell* 29, 421–436.
- Müller, G.J., Hasseldam, H., Rasmussen, R.S., and Johansen, F.F. (2014). Dexamethasone enhances necrosis-like neuronal death in ischemic rat hippocampus involving μ -calpain activation. *Exp. Neurol.*
- 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. (2010). ARQ 197, a Novel and Selective Inhibitor of the Human c-Met Receptor Tyrosine Kinase with Antitumor Activity. *Mol. Cancer Ther.* 9, 1544–1553.
- Musiani, D., Konda, J.D., Pavan, S., Torchiano, E., Sassi, F., Noghero, A., Erriquez, J., Perera, T., Olivero, M., and Di Renzo, M.F. (2014). Heat-shock protein 27 (HSP27, HSPB1) is up-regulated by MET kinase inhibitors and confers resistance to MET-targeted therapy. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*
- Nakagawa, T., and Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell Biol.* 150, 887–894.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., and Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434, 652–658.
- Nakamura, T., and Mizuno, S. (2010). The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 86, 588–610.
- Nakamura, T., Nawa, K., and Ichihara, A. (1984). Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatotomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 1450–1459.
- Nakamura, T., Nawa, K., Ichihara, A., Kaise, N., and Nishino, T. (1987). Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS Lett.* 224, 311–316.
- Nakayama, M., Sakai, K., Yamashita, A., Nakamura, T., Suzuki, Y., and Matsumoto, K. (2013). Met/HGF receptor activation is regulated by juxtamembrane Ser985 phosphorylation in hepatocytes. *Cytokine* 62, 446–452.
- Naldini, L., Vigna, E., Narsimhan, R.P., Gaudino, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K., and Comoglio, P.M. (1991a). Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 6, 501–504.
- Naldini, L., Weidner, K.M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzetto, C., Narsimhan, R.P., Hartmann, G., Zarnegar, R., and Michalopoulos, G.K. (1991b). Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J.* 10, 2867–2878.
- Naldini, L., Vigna, E., Ferracini, R., Longati, P., Gandino, L., Prat, M., and Comoglio, P.M. (1991c). The tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene is activated by autophosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 11, 1793–1803.
- Naresh, A., Long, W., Vidal, G.A., Wimley, W.C., Marrero, L., Sartor, C.I., Tovey, S., Cooke, T.G., Bartlett, J.M.S., and Jones, F.E. (2006). The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Res.* 66, 6412–6420.
- 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 J. Int. Cancer* 69, 212–217.
- 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.
- Naumann, T., Casademunt, E., Hollerbach, E., Hofmann, J., Dechant, G., Frotscher, M., and Barde, Y.-A. (2002). Complete deletion of the neurotrophin receptor p75NTR leads to long-lasting increases in the number of basal forebrain cholinergic neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 2409–2418.
- 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* N. Y. N 11, 1292–1300.
- Neufeld, G., Sabag, A.D., Rabinovicz, N., and Kessler, O. (2012). Semaphorins in angiogenesis and tumor progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006718.
- Neuhof, C., and Neuhof, H. (2014). Calpain system and its involvement in myocardial ischemia and reperfusion injury. *World J. Cardiol.* 6, 638–652.
- Neumar, R.W., Xu, Y.A., Gada, H., Guttmann, R.P., and Siman, R. (2003). Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 14162–14167.

- Ni, C.-Y., Murphy, M.P., Golde, T.E., and Carpenter, G. (2001). γ -Secretase Cleavage and Nuclear Localization of ErbB-4 Receptor Tyrosine Kinase. *Science* 294, 2179–2181.
- 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. *Hepato gastroenterology*. 46, 568–573.
- Nix, N.M., and Braun, K. (2014). Cabozantinib for the Treatment of Metastatic Medullary Thyroid Carcinoma. *J. Adv. Pract. Oncol.* 5, 47.
- O'Brien, L.E., Tang, K., Kats, E.S., Schutz-Geschwender, A., Lipschutz, J.H., and Mostov, K.E. (2004). ERK and MMPs sequentially regulate distinct stages of epithelial tubule development. *Dev. Cell* 7, 21–32.
- 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–L1039.
- Okamoto, I., Kawano, Y., Matsumoto, M., Suga, M., Kaibuchi, K., Ando, M., and Saya, H. (1999). Regulated CD44 cleavage under the control of protein kinase C, calcium influx, and the Rho family of small G proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 25525–25534.
- Okamoto, W., Okamoto, I., Arai, T., Kuwata, K., Hatashita, E., Yamaguchi, H., Sakai, K., Yanagihara, K., Nishio, K., and Nakagawa, K. (2012). Antitumor action of the MET tyrosine kinase inhibitor crizotinib (PF-02341066) in gastric cancer positive for MET amplification. *Mol. Cancer Ther.* 11, 1557–1564.
- Olaku, V., Matzke, A., Mitchell, C., Hasenauer, S., Sakkaravarthi, A., Pace, G., Ponta, H., and Orian-Rousseau, V. (2011). c-Met recruits ICAM-1 as a coreceptor to compensate for the loss of CD44 in Cd44 null mice. *Mol. Biol. Cell* 22, 2777–2786.
- Oliner, K.S., Tang, R., Anderson, A., Lan, Y., Iveson, T., Donehower, R.C., Jiang, Y., Dubey, S., and Loh, E. (2012). Evaluation of MET pathway biomarkers in a phase II study of rilotumumab (R, AMG 102) or placebo (P) in combination with epirubicin, cisplatin, and capecitabine (ECX) in patients (pts) with locally advanced or metastatic gastric (G) or esophagogastric junction (EGJ) cancer. *J. Clin. Oncol.* 30.
- Ollivier, N., Vicogne, J., Vallin, A., Drobecq, H., Desmet, R., El Mahdi, O., Leclercq, B., Goormachtigh, G., Fafeur, V., and Melnyk, O. (2012). A One-Pot Three-Segment Ligation Strategy for Protein Chemical Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 209–213.
- 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. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 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, 3074–3086.
- 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.
- Ou, S.-H.I., Kwak, E.L., Siwak-Tapp, C., Dy, J., Bergethon, K., Clark, J.W., Camidge, D.R., Solomon, B.J., Maki, R.G., Bang, Y.-J., et al. (2011). Activity of crizotinib (PF02341066), a dual mesenchymal-epithelial transition (MET) and anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor, in a non-small cell lung cancer patient with de novo MET amplification. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 6, 942–946.
- Owen, K.A., Qiu, D., Alves, J., Schumacher, A.M., Kilpatrick, L.M., Li, J., Harris, J.L., and Ellis, V. (2010). 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, 219–228.
- Ozaki, I., Zhao, G., Mizuta, T., Ogawa, Y., Hara, T., Kajihara, S., Hisatomi, A., Sakai, T., and Yamamoto, K. (2002). Hepatocyte growth factor induces collagenase (matrix metalloproteinase-1) via the transcription factor Ets-1 in human hepatic stellate cell line. *J. Hepatol.* 36, 169–178.
- Pacchiana, G., Chiriaco, C., Stella, M.C., Petronzelli, F., De Santis, R., Galluzzo, M., Carminati, P., Comoglio, P.M., Michieli, P., and Vigna, E. (2010). Monovalency unleashes the full therapeutic potential of the DN-30 anti-Met antibody. *J. Biol. Chem.* 285, 36149–36157.
- Pàez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Viñals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., and Casanovas, O. (2009). Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis. *Cancer Cell* 15, 220–231.
- Panigrahi, A.K., Zhang, N., Mao, Q., and Pati, D. (2011). Calpain-1 cleaves Rad21 to promote sister chromatid separation. *Mol. Cell Biol.* 31, 4335–4347.
- Parikh, R.A., Wang, P., Beumer, J.H., Chu, E., and Appleman, L.J. (2014). The potential roles of hepatocyte growth factor (HGF)-MET pathway inhibitors in cancer treatment. *OncoTargets Ther.* 7, 969–983.
- 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, 6379–6383.
- 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, 213–219.
- Park, S., Choi, Y.-L., Sung, C.O., An, J., Seo, J., Ahn, M.-J., Ahn, J.S., Park, K., Shin, Y.K., Erkin, O.C., et al. (2012). High MET copy number and MET overexpression: poor outcome in non-small cell lung cancer patients. *Histol. Histopathol.* 27, 197–207.

- Park, W.S., Dong, S.M., Kim, S.Y., Na, E.Y., Shin, M.S., Pi, J.H., Kim, B.J., Bae, J.H., Hong, Y.K., Lee, K.S., et al. (1999). Somatic mutations in the kinase domain of the Met/hepatocyte growth factor receptor gene in childhood hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 59, 307–310.
- Parr, T., Jewell, K.K., Sensky, P.L., Brameld, J.M., Bardsley, R.G., and Buttery, P.J. (2004). Expression of calpastatin isoforms in muscle and functionality of multiple calpastatin promoters. *Arch. Biochem. Biophys.* 427, 8–15.
- Pelicci, G., Giordano, S., Zhen, Z., Salcini, A.E., Lanfrancone, L., Bardelli, A., Panayotou, G., Waterfield, M.D., Ponzetto, C., and Pelicci, P.G. (1995). The mitogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein. *Oncogene* 10, 1631–1638.
- Peng, Y., Huentelman, M., Smith, C., and Qiu, S. (2013). MET Receptor Tyrosine Kinase as an Autism Genetic Risk Factor. *Int. Rev. Neurobiol.* 113, 135–165.
- Peng, Z., Zhu, Y., Wang, Q., Gao, J., Li, Y., Li, Y., Ge, S., and Shen, L. (2014). Prognostic significance of MET amplification and expression in gastric cancer: a systematic review with meta-analysis. *PLoS One* 9, e84502.
- 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, 347–361.
- Perrin, B.J., Amann, K.J., and Huttenlocher, A. (2006). Proteolysis of cortactin by calpain regulates membrane protrusion during cell migration. *Mol. Biol. Cell* 17, 239–250.
- 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., 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.
- 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, 5090–5095.
- Phaneuf, D., Moscioni, A.D., LeClair, C., Raper, S.E., and Wilson, J.M. (2004a). 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.
- Phaneuf, D., Moscioni, A.D., LeClair, C., Raper, S.E., and Wilson, J.M. (2004b). 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.
- Pianetti, S., Arsur, M., Romieu-Mourez, R., Coffey, R.J., and Sonenshein, G.E. (2001). Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of I-kappaB-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN. *Oncogene* 20, 1287–1299.
- Piot, C., Croisille, P., Staat, P., Thibault, H., Rioufol, G., Mewton, N., Elbelghiti, R., Cung, T.T., Bonnefoy, E., Angoulvant, D., et al. (2008). Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 359, 473–481.
- Polster, B.M., Basañez, G., Etxebarria, A., Hardwick, J.M., and Nicholls, D.G. (2005). Calpain I Induces Cleavage and Release of Apoptosis-inducing Factor from Isolated Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280, 6447–6454.
- Ponta, H., Sherman, L., and Herrlich, P.A. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 33–45.
- 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.
- 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, 261–271.
- Ponzo, M.G., Lesurf, R., Petkiewicz, S., O'Malley, F.P., Pinnaduwage, D., Andrulis, I.L., Bull, S.B., Chughtai, N., Zuo, D., Souleimanova, M., et al. (2009). Met induces mammary tumors with diverse histologies and is associated with poor outcome and human basal breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12903–12908.
- Popp, O., Heindinger, M., Ruiz-Heinrich, L., Ries, C., Jochum, M., and Gil-Parrado, S. (2003). The calpastatin-derived calpain inhibitor CP1B reduces mRNA expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and invasion by leukemic THP-1 cells. *Biol. Chem.* 384, 951–958.
- Popsueva, A., Poteryaev, D., Arighi, E., Meng, X., Angers-Loustau, A., Kaplan, D., Saarma, M., and Sariola, H. (2003). GDNF promotes tubulogenesis of GFRalpha1-expressing MDCK cells by Src-mediated phosphorylation of Met receptor tyrosine kinase. *J. Cell Biol.* 161, 119–129.
- Postovit, L.-M., Dutt, P., Dourdin, N., Park, M., Greer, P.A., Graham, C.H., and Elce, J.S. (2002). Calpain is required for MMP-2 and u-PA expression in SV40 large T-antigen-immortalized cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 294–301.
- Potter, D.A., Tirnauer, J.S., Janssen, R., Croall, D.E., Hughes, C.N., Fiacco, K.A., Mier, J.W., Maki, M., and Herman, I.M. (1998). Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J. Cell Biol.* 141, 647–662.
- 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.

- 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), 237–247.
- Previdi, S., Abbadessa, G., Dalò, F., France, D.S., and Broggin, M. (2012). Breast Cancer–Derived Bone Metastasis Can Be Effectively Reduced through Specific c-MET Inhibitor Tivantinib (ARQ 197) and shRNA c-MET Knockdown. *Mol. Cancer Ther.* *11*, 214–223.
- 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. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *231*, 582–591.
- Qi, J., McTigue, M.A., Rogers, A., Lifshits, E., Christensen, J.G., Jänne, P.A., and Engelman, J.A. (2011). Multiple mutations and bypass mechanisms can contribute to development of acquired resistance to MET inhibitors. *Cancer Res.* *71*, 1081–1091.
- Rabizadeh, S., Oh, J., Zhong, L.T., Yang, J., Bitler, C.M., Butcher, L.L., and Bredesen, D.E. (1993). Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* *261*, 345–348.
- 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. JASN* *12*, 531–540.
- 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*, 33714–33721.
- Raibaut, L., Vicogne, J., Leclercq, B., Drobecq, H., Desmet, R., and Melnyk, O. (2013). Total synthesis of biotinylated N domain of human hepatocyte growth factor. *Bioorg. Med. Chem.* *21*, 3486–3494.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., et al. (2010). Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* *90*, 1383–1435.
- Ray, S.D., Mumaw, V.R., Raje, R.R., and Fariss, M.W. (1996). Protection of acetaminophen-induced hepatocellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *279*, 1470–1483.
- Raymond, W.W., Cruz, A.C., and Caughey, G.H. (2006). Mast cell and neutrophil peptidases attack an inactivation segment in hepatocyte growth factor to generate NK4-like antagonists. *J. Biol. Chem.* *281*, 1489–1494.
- Recio, J.A., and Merlino, G. (2002). Hepatocyte growth factor/scatter factor activates proliferation in melanoma cells through p38 MAPK, ATF-2 and cyclin D1. *Oncogene* *21*, 1000–1008.
- Reichrath, J., Welter, C., Mitschele, T., Classen, U., Meineke, V., Tilgen, W., and Seifert, M. (2003). Different expression patterns of calpain isozymes 1 and 2 (CAPN1 and 2) in squamous cell carcinomas (SCC) and basal cell carcinomas (BCC) of human skin. *J. Pathol.* *199*, 509–516.
- Di Renzo, M.F., Olivero, M., Martone, T., Maffe, A., Maggiora, P., Stefani, A.D., Valente, G., Giordano, S., Cortesina, G., and Comoglio, P.M. (2000). Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. *Oncogene* *19*, 1547–1555.
- Reznik, T.E., Sang, Y., Ma, Y., Abounader, R., Rosen, E.M., Xia, S., and Latta, J. (2008). Transcription-dependent epidermal growth factor receptor activation by hepatocyte growth factor. *Mol. Cancer Res. MCR* *6*, 139–150.
- Ridley, A.J., Comoglio, P.M., and Hall, A. (1995). Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol. Cell Biol.* *15*, 1110–1122.
- Rios-Doria, J., Kuefer, R., Ethier, S.P., and Day, M.L. (2004). Cleavage of beta-catenin by calpain in prostate and mammary tumor cells. *Cancer Res.* *64*, 7237–7240.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 566–578.
- 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*, 6711–6722.
- Rodrigues, G.A., Park, M., and Schlessinger, J. (1997). Activation of the JNK pathway is essential for transformation by the Met oncogene. *EMBO J.* *16*, 2634–2645.
- 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.
- Rosário, M., and Birchmeier, W. (2003). How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* *13*, 328–335.
- Roumes, H., Leloup, L., Dargelos, E., Brustis, J.-J., Daury, L., and Cottin, P. (2010). Calpains: Markers of tumor aggressiveness? *Exp. Cell Res.* *316*, 1587–1599.
- Ruchaud, S., Korfali, N., Villa, P., Kottke, T.J., Dingwall, C., Kaufmann, S.H., and Earnshaw, W.C. (2002). Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *EMBO J.* *21*, 1967–1977.
- Rudnick, S.I., Lou, J., Shaller, C.C., Tang, Y., Klein-Szanto, A.J.P., Weiner, L.M., Marks, J.D., and Adams, G.P. (2011). Influence of affinity and antigen internalization on the uptake and penetration of Anti-HER2 antibodies in solid tumors. *Cancer Res.* *71*, 2250–2259.

- Sachs, M., Brohmann, H., Zechner, D., Müller, T., Hülsken, 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*, 1375–1384.
- Sahara, S., and Yamashima, T. (2010). Calpain-mediated Hsp70.1 cleavage in hippocampal CA1 neuronal death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *393*, 806–811.
- Saido, T.C., Shibata, M., Takenawa, T., Murofushi, H., and Suzuki, K. (1992). Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. *J. Biol. Chem.* *267*, 24585–24590.
- Sakai, K., Nakamura, T., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (2009). Angioinhibitory action of NK4 involves impaired extracellular assembly of fibronectin mediated by perlecan-NK4 association. *J. Biol. Chem.* *284*, 22491–22499.
- Salamino, F., Averna, M., Tedesco, I., De Tullio, R., Melloni, E., and Pontremoli, S. (1997). Modulation of rat brain calpastatin efficiency by post-translational modifications. *FEBS Lett.* *412*, 433–438.
- Salehin, D., Fromberg, I., Haugk, C., Dohmen, B., Georg, T., Bohle, R.M., Bauerschlag, D., Maass, N., and Friedrich, M. (2010). Immunohistochemical analysis for expression of calpain 1, calpain 2 and calpastatin in endometrial cancer. *Anticancer Res.* *30*, 2837–2843.
- Santoro, A., Rimassa, L., Borbath, I., Daniele, B., Salvagni, S., Van Laethem, J.L., Van Vlierberghe, H., Trojan, J., Kolligs, F.T., Weiss, A., et al. (2013). Tivantinib for second-line treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Oncol.* *14*, 55–63.
- Sareen, D., Darjatmoko, S.R., Albert, D.M., and Polans, A.S. (2007). Mitochondria, calcium, and calpain are key mediators of resveratrol-induced apoptosis in breast cancer. *Mol. Pharmacol.* *72*, 1466–1475.
- Sato, M., Kakubari, M., Kawamura, M., Sugimoto, J., Matsumoto, K., and Ishii, T. (2000). The decrease in total collagen fibers in the liver by hepatocyte growth factor after formation of cirrhosis induced by thioacetamide. *Biochem. Pharmacol.* *59*, 681–690.
- Sato-Kusubata, K., Yajima, Y., and Kawashima, S. (2000). Persistent activation of G α through limited proteolysis by calpain. *Biochem. J.* *347 Pt 3*, 733–740.
- Sattler, M., Pride, Y.B., Ma, P., Gramlich, J.L., Chu, S.C., Quinnan, L.A., Shirazian, S., Liang, C., Podar, K., Christensen, J.G., et al. (2003). A Novel Small Molecule Met Inhibitor Induces Apoptosis in Cells Transformed by the Oncogenic TPR-MET Tyrosine Kinase. *Cancer Res.* *63*, 5462–5469.
- Saucier, C., Khoury, H., Lai, K.-M.V., 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*, 2345–2350.
- Scagliotti, G.V., Novello, S., Schiller, J.H., Hirsh, V., Sequist, L.V., Soria, J.-C., von Pawel, J., Schwartz, B., Von Roemeling, R., and Sandler, A.B. (2012). Rationale and design of MARQUEE: a phase III, randomized, double-blind study of tivantinib plus erlotinib versus placebo plus erlotinib in previously treated patients with locally advanced or metastatic, nonsquamous, non-small-cell lung cancer. *Clin. Lung Cancer* *13*, 391–395.
- Scagliotti, G.V., Novello, S., and von Pawel, J. (2013). The emerging role of MET/HGF inhibitors in oncology. *Cancer Treat. Rev.* *39*, 793–801.
- 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*, 352–358.
- 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*, 1419–1432.
- Schelter, F., Kobuch, J., Moss, M.L., Becherer, J.D., Comoglio, P.M., Boccaccio, C., and Krüger, A. (2010). A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor. *J. Biol. Chem.* *285*, 26335–26340.
- Schiering, N., Knapp, S., Marconi, M., Flocco, M.M., Cui, J., Perego, R., Rusconi, L., and Cristiani, C. (2003). Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the hepatocyte growth factor receptor c-Met and its complex with the microbial alkaloid K-252a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12654–12659.
- 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.
- Schöffski, P., Garcia, J.A., Stadler, W.M., Gil, T., Jonasch, E., Tagawa, S.T., Smitt, M., Yang, X., Oliner, K.S., Anderson, A., et al. (2011). A phase II study of the efficacy and safety of AMG 102 in patients with metastatic renal cell carcinoma. *BJU Int.* *108*, 679–686.
- Schoffski, P., Elisei, R., Müller, S., Brose, M.S., Shah, M.H., Licitra, L.F., Jarzab, B., Medvedev, V., Kreissl, M., Niederle, B., et al. (2012). An international, double-blind, randomized, placebo-controlled phase III trial (EXAM) of cabozantinib (XL184) in medullary thyroid carcinoma (MTC) patients (pts) with documented RECIST progression at baseline. *J. Clin. Oncol.* *30*.
- Schutte, B., Henfling, M., Kölgen, W., Bouman, M., Meex, S., Leers, M.P.G., Nap, M., Björklund, V., Björklund, P., Björklund, B., et al. (2004). Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp. Cell Res.* *297*, 11–26.
- Schwall, R.H., Chang, L.Y., Godowski, P.J., Kahn, D.W., Hillan, K.J., Bauer, K.D., and Zioncheck, T.F. (1996). Heparin induces dimerization and confers proliferative activity onto the hepatocyte growth factor antagonists NK1 and NK2. *J. Cell Biol.* *133*, 709–718.

- Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., and Bréard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat. Cell Biol.* 3, 346–352.
- Sedarous, M., Keramaris, E., O'Hare, M., Melloni, E., Slack, R.S., Elce, J.S., Greer, P.A., and Park, D.S. (2003). Calpains mediate p53 activation and neuronal death evoked by DNA damage. *J. Biol. Chem.* 278, 26031–26038.
- Seki, T., Hagiya, M., Shimonishi, M., Nakamura, T., and Shimizu, S. (1991). Organization of the human hepatocyte growth factor-encoding gene. *Gene* 102, 213–219.
- Sensky, P.L., Jewell, K.K., Ryan, K.J.P., Parr, T., Bardsley, R.G., and Buttery, P.J. (2006). Effect of anabolic agents on calpastatin promoters in porcine skeletal muscle and their responsiveness to cyclic adenosine monophosphate-and calcium-related stimuli. *J. Anim. Sci.* 84, 2973–2982.
- Sequist, L.V., von Pawel, J., Garmey, E.G., Akerley, W.L., Brugger, W., Ferrari, D., Chen, Y., Costa, D.B., Gerber, D.E., Orlov, S., et al. (2011). Randomized phase II study of erlotinib plus tivantinib versus erlotinib plus placebo in previously treated non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 3307–3315.
- Sergeev, I.N. (2004). Genistein induces Ca²⁺-mediated, calpain/caspase-12-dependent apoptosis in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 462–467.
- Shao, H., Chou, J., Baty, C.J., Burke, N.A., Watkins, S.C., Stolz, D.B., and Wells, A. (2006). Spatial localization of m-calpain to the plasma membrane by phosphoinositide biphosphate binding during epidermal growth factor receptor-mediated activation. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5481–5496.
- Shattuck, D.L., Miller, J.K., Laederich, M., Funes, M., Petersen, H., Carraway, K.L., and Sweeney, C. (2007). LRIG1 is a novel negative regulator of the Met receptor and opposes Met and Her2 synergy. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1934–1946.
- Shattuck, D.L., Miller, J.K., Carraway, K.L., and Sweeney, C. (2008). Met Receptor Contributes to Trastuzumab Resistance of Her2-Overexpressing Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 68, 1471–1477.
- Shea, T.B., Spencer, M.J., Beermann, M.L., Cressman, C.M., and Nixon, R.A. (1996). Calcium influx into human neuroblastoma cells induces ALZ-50 immunoreactivity: involvement of calpain-mediated hydrolysis of protein kinase C. *J. Neurochem.* 66, 1539–1549.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., and Ireton, K. (2000). InIB-dependent internalization of Listeria is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* 103, 501–510.
- Shiba, null, Kambayashi, null, Sakon, null, Kawasaki, null, Kobayashi, null, Koyama, null, Yayoi, null, Takatsuka, null, and Takai, null (1996). Ca²⁺-Dependent Neutral Protease (Calpain) Activity in Breast Cancer Tissue and Estrogen Receptor Status. *Breast Cancer Tokyo Jpn.* 3, 13–17.
- Shibata, D., Reale, M.A., Lavin, P., Silverman, M., Fearon, E.R., Steele, G., Jessup, J.M., Loda, M., and Summerhayes, I.C. (1996). The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 335, 1727–1732.
- Shieh, J.-M., Tang, Y.-A., Yang, T.-H., Chen, C.-Y., Hsu, H.-S., Tan, Y.-H.C., Salgia, R., and Wang, Y.-C. (2013). Lack of association of C-Met-N375S sequence variant with lung cancer susceptibility and prognosis. *Int. J. Med. Sci.* 10, 988–994.
- Shields, D.C., Schaecher, K.E., Saido, T.C., and Banik, N.L. (1999). A putative mechanism of demyelination in multiple sclerosis by a proteolytic enzyme, calpain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11486–11491.
- Shigematsu, H., Yasuda, K., Iwai, T., Sasajima, T., Ishimaru, S., Ohashi, Y., Yamaguchi, T., Ogihara, T., and Morishita, R. (2010). Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of hepatocyte growth factor plasmid for critical limb ischemia. *Gene Ther.* 17, 1152–1161.
- Shim, H.-Y., Park, J.-H., Paik, H.-D., Nah, S.-Y., Kim, D.S.H.L., and Han, Y.S. (2007). Genistein-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves calpain-caspase and apoptosis signaling kinase 1-p38 mitogen-activated protein kinase activation cascades. *Anticancer. Drugs* 18, 649–657.
- 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, 188–194.
- Shiota, G., Wang, T.C., Nakamura, T., and Schmidt, E.V. (1994). Hepatocyte growth factor in transgenic mice: effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression. *Hepatol. Baltim. Md* 19, 962–972.
- Shiraha, H., Glading, A., Chou, J., Jia, Z., and Wells, A. (2002). Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2716–2727.
- Shojaei, F., Lee, J.H., Simmons, B.H., Wong, A., Esparza, C.O., Plumlee, P.A., Feng, J., Stewart, A.E., Hu-Lowe, D.D., and Christensen, J.G. (2010). HGF/c-Met Acts as an Alternative Angiogenic Pathway in Sunitinib-Resistant Tumors. *Cancer Res.* 70, 10090–10100.
- 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, 433–439.
- Singleton, P.A., Salgia, R., Moreno-Vinasco, L., Moitra, J., Sammani, S., Mirzapioazova, T., and Garcia, J.G.N. (2007). CD44 regulates hepatocyte growth factor-mediated vascular integrity. Role of c-Met, Tiam1/Rac1, dynamin 2, and cortactin. *J. Biol. Chem.* 282, 30643–30657.
- 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, 2316–2321.
- Smyth, L.A., and Brady, H.J.M. (2005). cMet and Fas receptor interaction inhibits death-inducing signaling complex formation in endothelial cells. *Hypertension* 46, 100–106.

- Song, Y., Su, M., Panchatsharam, P., Rood, D., and Lai, L. (2014). c-Met signaling is required for efficient postnatal thymic regeneration and repair. *Immunology*.
- Sonnenberg, E., Meyer, D., Weidner, K.M., and Birchmeier, C. (1993). Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J. Cell Biol.* *123*, 223–235.
- Soong, J., and Scott, G. (2013). Plexin B1 inhibits MET through direct association and regulates Shp2 expression in melanocytes. *J. Cell Sci.* *126*, 688–695.
- Soong, J., Chen, Y., Shustef, E.M., and Scott, G.A. (2012). Sema4D, the ligand for Plexin B1, suppresses c-Met activation and migration and promotes melanocyte survival and growth. *J. Invest. Dermatol.* *132*, 1230–1238.
- Sorimachi, H., Hata, S., and Ono, Y. (2010). Expanding members and roles of the calpain superfamily and their genetically modified animals. *Exp. Anim. Jpn. Assoc. Lab. Anim. Sci.* *59*, 549–566.
- Spigel, D.R., Ervin, T.J., Ramlau, R.A., Daniel, D.B., Goldschmidt, J.H., Blumenschein, G.R., Krzakowski, M.J., Robinet, G., Godbert, B., Barlesi, F., et al. (2013). Randomized phase II trial of Onartuzumab in combination with erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *31*, 4105–4114.
- Spigel, D.R., Edelman, M.J., O'Byrne, K., Paz-Ares, L., Shames, D.S., Yu, W., Paton, V.E., and Mok, T. (2014). Onartuzumab plus erlotinib versus erlotinib in previously treated stage IIIb or IV NSCLC: Results from the pivotal phase III randomized, multicenter, placebo-controlled METLung (OAM4971g) global trial. *J. Clin. Oncol.* *32*:5s.
- Stamos, J., Lazarus, R.A., Yao, X., Kirchofer, 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*, 2325–2335.
- Stevens, L., McClelland, L., Fricke, A., Williamson, M., Kuo, I., and Scott, G. (2010). Plexin B1 suppresses c-Met in melanoma: a role for plexin B1 as a tumor-suppressor protein through regulation of c-Met. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 1636–1645.
- Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M., and Gray, J. (1987). Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* *327*, 239–242.
- Storr, S.J., Carragher, N.O., Frame, M.C., Parr, T., and Martin, S.G. (2011a). The calpain system and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 364–374.
- Storr, S.J., Woolston, C.M., Barros, F.F.T., Green, A.R., Shehata, M., Chan, S.Y., Ellis, I.O., and Martin, S.G. (2011b). Calpain-1 expression is associated with relapse-free survival in breast cancer patients treated with trastuzumab following adjuvant chemotherapy. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *129*, 1773–1780.
- Strobl, S., Fernandez-Catalan, C., Braun, M., Huber, R., Masumoto, H., Nakagawa, K., Irie, A., Sorimachi, H., Bourenkow, G., Bartunik, H., et al. (2000). The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 588–592.
- Struewing, I.T., Barnett, C.D., Zhang, W., Yadav, S., and Mao, C.D. (2007). Frizzled-7 turnover at the plasma membrane is regulated by cell density and the Ca(2+) -dependent protease calpain-1. *Exp. Cell Res.* *313*, 3526–3541.
- Su, Y., Cui, Z., Li, Z., and Block, E.R. (2006). Calpain-2 regulation of VEGF-mediated angiogenesis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 1443–1451.
- Sulpice, E., Ding, S., Muscatelli-Groux, B., Bergé, M., Han, Z.C., Plouet, J., Tobelem, G., and Merkulova-Rainon, T. (2009). Cross-talk between the VEGF-A and HGF signalling pathways in endothelial cells. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *101*, 525–539.
- Sun, X.F., Rütten, S., Zhang, H., and Nordenskjöld, B. (1999). Expression of the deleted in colorectal cancer gene is related to prognosis in DNA diploid and low proliferative colorectal adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *17*, 1745–1750.
- Suzuki, K., Tsuji, S., Kubota, S., Kimura, Y., and Imahori, K. (1981). Limited autolysis of Ca²⁺-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca²⁺ ions. *J. Biochem. (Tokyo)* *90*, 275–278.
- Tachibana, K., Minami, Y., Shiba-Ishii, A., Kano, J., Nakazato, Y., Sato, Y., Goya, T., and Noguchi, M. (2012). Abnormality of the hepatocyte growth factor/MET pathway in pulmonary adenocarcinogenesis. *Lung Cancer Amst. Neth.* *75*, 181–188.
- Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol.* *8*, 215.
- Takano, J., Watanabe, M., Hitomi, K., and Maki, M. (2000). Four types of calpastatin isoforms with distinct amino-terminal sequences are specified by alternative first exons and differentially expressed in mouse tissues. *J. Biochem. (Tokyo)* *128*, 83–92.
- Takayama, H., LaRochelle, W.J., Sharp, R., Otsuka, T., Kriebel, P., Anver, M., Aaronson, S.A., and Merlino, G. (1997). Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 701–706.
- Tan, Y., Wu, C., De Veyra, T., and Greer, P.A. (2006). Ubiquitous calpains promote both apoptosis and survival signals in response to different cell death stimuli. *J. Biol. Chem.* *281*, 17689–17698.
- Tanaka, H., Kimura, T., Kudoh, S., Mitsuoka, S., Watanabe, T., Suzumura, T., Tachibana, K., Noguchi, M., Yano, S., and Hirata, K. (2011). Reaction of plasma hepatocyte growth factor levels in non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. *Int. J. Cancer* *129*, 1410–1416.
- 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*, 1293–1303.
- Tanizaki, J., Okamoto, I., Okamoto, K., Takezawa, K., Kuwata, K., Yamaguchi, H., and Nakagawa, K. (2011). MET tyrosine kinase inhibitor crizotinib (PF-02341066) shows differential antitumor effects in non-small cell

- lung cancer according to MET alterations. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 6, 1624–1631.
- 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.
- Teng, L., and Lu, J. (2013). cMET as a potential therapeutic target in gastric cancer (Review). *Int. J. Mol. Med.* 32, 1247–1254.
- Das Thakur, M., Salangsang, F., Landman, A.S., Sellers, W.R., Pryer, N.K., Levesque, M.P., Dummer, R., McMahon, M., and Stuart, D.D. (2013). Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature* 494, 251–255.
- Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., et al. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 17907–17911.
- Tidball, J.G., and Spencer, M.J. (2000). Calpains and muscular dystrophies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 1–5.
- 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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 4, 659–664.
- 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 J. Int. Cancer* 125, 1657–1662.
- Tolbert, W.D., Daugherty-Holtrop, J., Gherardi, E., Vande Woude, G., and Xu, H.E. (2010). Structural basis for agonism and antagonism of hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13264–13269.
- Tompa, P., Emori, Y., Sorimachi, H., Suzuki, K., and Friedrich, P. (2001). Domain III of calpain is a Ca^{2+} -regulated phospholipid-binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 1333–1339.
- Tompa, P., Buzder-Lantos, P., Tantos, A., Farkas, A., Szilágyi, A., Bánóczy, Z., Hudecz, F., and Friedrich, P. (2004). On the sequential determinants of calpain cleavage. *J. Biol. Chem.* 279, 20775–20785.
- Toschi, L., and Cappuzzo, F. (2010). Clinical implications of MET gene copy number in lung cancer. *Future Oncol. Lond. Engl.* 6, 239–247.
- Trusolino, L., Bertotti, A., and Comoglio, P.M. (2001). A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell* 107, 643–654.
- Trusolino, L., Bertotti, A., and Comoglio, P.M. (2010). MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 834–848.
- Tsuta, K., Kozu, Y., Mimae, T., Yoshida, A., Kohno, T., Sekine, I., Tamura, T., Asamura, H., Furuta, K., and Tsuda, H. (2012). c-MET/phospho-MET protein expression and MET gene copy number in non-small cell lung carcinomas. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 7, 331–339.
- 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.
- 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, 10328–10339.
- 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., et al. (2010). MET receptor sequence variants R970C and T992I lack transforming capacity. *Cancer Res.* 70, 6233–6237.
- Uchida, D., Kawamata, H., Omotehara, F., Nakashiro, K., Kimura-Yanagawa, T., Hino, S., Begum, N.M., Hoque, M.O., Yoshida, H., Sato, M., et al. (2001). Role of HGF/c-met system in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells in vitro and its clinical significance. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 93, 489–496.
- 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, 702–705.
- Unemori, E.N., and Werb, Z. (1988). Collagenase expression and endogenous activation in rabbit synovial fibroblasts stimulated by the calcium ionophore A23187. *J. Biol. Chem.* 263, 16252–16259.
- Vaisid, T., Kosower, N.S., Katzav, A., Chapman, J., and Barnoy, S. (2007). Calpastatin levels affect calpain activation and calpain proteolytic activity in APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 51, 391–397.
- Vaisid, T., Barnoy, S., and Kosower, N.S. (2008). Calpastatin overexpression attenuates amyloid-beta-peptide toxicity in differentiated PC12 cells. *Neuroscience* 156, 921–931.
- Valente, G., Nicotra, G., Arrondini, M., Castino, R., Capparuccia, L., Prat, M., Kerim, S., Tamagnone, L., and Isidoro, C. (2009). Co-expression of plexin-B1 and Met in human breast and ovary tumours enhances the risk of progression. *Cell. Oncol. Off. J. Int. Soc. Cell. Oncol.* 31, 423–436.
- Vanderklis, P.W., and Bahr, B.A. (2000). The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states. *Int. J. Exp. Pathol.* 81, 323–339.
- 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.
- Varkaris, A., Gaur, S., Parikh, N.U., Song, J.H., Dayyani, F., Jin, J.-K., Logothetis, C.J., and Gallick, G.E. (2013). Ligand-independent activation of MET through IGF-1/IGF-1R signaling. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 133, 1536–1546.

- Veeranna, null, Kaji, T., Boland, B., Odrliin, T., Mohan, P., Basavarajappa, B.S., Peterhoff, C., Cataldo, A., Rudnicki, A., Amin, N., et al. (2004). Calpain mediates calcium-induced activation of the erk1,2 MAPK pathway and cytoskeletal phosphorylation in neurons: relevance to Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 165, 795–805.
- Veiga, E., and Cossart, P. (2005). *Listeria* hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 7, 894–900.
- Velcich, A., Corner, G., Palumbo, L., and Augenlicht, L. (1999). Altered phenotype of HT29 colonic adenocarcinoma cells following expression of the DCC gene. *Oncogene* 18, 2599–2606.
- Velez-Pardo, C., Arroyave, S.T., Lopera, F., Castaño, A.D., and Rio, M.J.D. (2001). Ultrastructure evidence of necrotic neural cell death in familial Alzheimer's disease brains bearing presenilin-1 E280A mutation. *J. Alzheimers Dis.* 3, 409–415.
- Vigna, E., and Comoglio, P.M. (2014). Targeting the oncogenic Met receptor by antibodies and gene therapy. *Oncogene*.
- Vigna, E., Pacchiana, G., Chiriaco, C., Cignetto, S., Fontani, L., Michieli, P., and Comoglio, P.M. (2014). Targeted therapy by gene transfer of a monovalent antibody fragment against the Met oncogenic receptor. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 92, 65–76.
- 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, 6499–6506.
- Vosler, P.S., Brennan, C.S., and Chen, J. (2008). Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 38, 78–100.
- Wader, K.F., Fagerli, U.-M., Holt, R.U., Børset, M., Sundan, A., and Waage, A. (2011). Soluble c-Met in serum of patients with multiple myeloma: correlation with clinical parameters. *Eur. J. Haematol.* 87, 394–399.
- Wali, V.B., Haskins, J.W., Gilmore-Hebert, M., Platt, J.T., Liu, Z., and Stern, D.F. (2014). Convergent and divergent cellular responses by ErbB4 isoforms in mammary epithelial cells. *Mol. Cancer Res. MCR* 12, 1140–1155.
- Wang, K., Zhuang, Y., Liu, C., and Li, Y. (2012). Inhibition of c-Met activation sensitizes osteosarcoma cells to cisplatin via suppression of the PI3K–Akt signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* 526, 38–43.
- Wang, K.K., Posner, A., Raser, K.J., Buroker-Kilgore, M., Nath, R., Hajimohammadreza, I., Probert, A.W., Marcoux, F.W., Lunney, E.A., Hays, S.J., et al. (1996). Alpha-mercaptoacrylic acid derivatives as novel selective calpain inhibitors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 389, 95–101.
- Wang, K.K.W., Posmantur, R., Nadimpalli, R., Nath, R., Mohan, P., Nixon, R.A., Talanian, R.V., Keegan, M., Herzog, L., and Allen, H. (1998). Caspase-Mediated Fragmentation of Calpain Inhibitor Protein Calpastatin during Apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 356, 187–196.
- Wang, R., Ferrell, L.D., Faouzi, S., Maher, J.J., and Bishop, J.M. (2001). Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J. Cell Biol.* 153, 1023–1034.
- Wang, S., Pashtan, I., Tsutsumi, S., Xu, W., and Neckers, L. (2009). Cancer cells harboring MET gene amplification activate alternative signaling pathways to escape MET inhibition but remain sensitive to Hsp90 inhibitors. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 2050–2056.
- Wang, W., Marimuthu, A., Tsai, J., Kumar, A., Krupka, H.I., Zhang, C., Powell, B., Suzuki, Y., Nguyen, H., Tabrizi, 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, 3563–3568.
- 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, 411–421.
- Wei, Z., Song, M.S., MacTavish, D., Jhamandas, J.H., and Kar, S. (2008). Role of calpain and caspase in beta-amyloid-induced cell death in rat primary septal cultured neurons. *Neuropharmacology* 54, 721–733.
- Weidner, K.M., Arakaki, N., Hartmann, G., Vandekerckhove, J., Weingart, S., Rieder, H., Fonatsch, C., Tsubouchi, H., Hishida, T., and Daikuhara, Y. (1991). Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7001–7005.
- 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, 2597–2601.
- Weidner, K.M., Di Cesare, S., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J., and Birchmeier, W. (1996). Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* 384, 173–176.
- Weinstein, I.B., and Joe, A. (2008). Oncogene addiction. *Cancer Res.* 68, 3077–3080; discussion 3080.
- Wen, P.Y., Schiff, D., Cloughesy, T.F., Raizer, J.J., Laterra, J., Smitt, M., Wolf, M., Oliner, K.S., Anderson, A., Zhu, M., et al. (2011). A phase II study evaluating the efficacy and safety of AMG 102 (rilutumab) in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 13, 437–446.
- Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E.K., Saiki, S., Siddiqi, F.H., Jahreiss, L., Fleming, A., Pask, D., Goldsmith, P., et al. (2008). Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat. Chem. Biol.* 4, 295–305.
- Wingertzahn, M.A., Zdanowicz, M.M., and Slonim, A.E. (1998). Insulin-like growth factor-I and high protein diet decrease calpain-mediated proteolysis in murine muscular dystrophy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 218, 244–250.

- Witkowski, J.M., Zmuda-Trzebiatowska, E., Swiercz, J.M., Cichorek, M., Ciepluch, H., Lewandowski, K., Bryl, E., and Hellmann, A. (2002). Modulation of the activity of calcium-activated neutral proteases (calpains) in chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. *Blood* 100, 1802–1809.
- Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., Andrian, U.H. von, Deryugina, E.I., Strongin, A.Y., Bröcker, E.-B., and Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration mesenchymal–amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J. Cell Biol.* 160, 267–277.
- Xiang, Q., Chen, W., Ren, M., Wang, J., Zhang, H., Deng, D.Y.B., Zhang, L., Shang, C., and Chen, Y. (2014). Cabozantinib Suppresses Tumor Growth and Metastasis in Hepatocellular Carcinoma by a Dual Blockade of VEGFR2 and MET. *Clin. Cancer Res.* 20, 2959–2970.
- Xiao, G.H., Jeffers, M., Bellacosa, A., Mitsuuchi, Y., Vande Woude, G.F., and Testa, J.R. (2001). Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 247–252.
- Xie, S.-Q., Zhang, Z.-Q., Hu, G.-Q., Xu, M., and Ji, B.-S. (2008). HL-37, a novel anthracene derivative, induces Ca(2+)-mediated apoptosis in human breast cancer cells. *Toxicology* 254, 68–74.
- Xu, K.-P., and Yu, F.-S.X. (2007). Cross talk between c-Met and epidermal growth factor receptor during retinal pigment epithelial wound healing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 2242–2248.
- Xu, L., and Deng, X. (2004). Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induces phosphorylation of mu- and m-calpain in association with increased secretion, cell migration, and invasion. *J. Biol. Chem.* 279, 53683–53690.
- Xu, L., and Deng, X. (2006a). Suppression of cancer cell migration and invasion by protein phosphatase 2A through dephosphorylation of mu- and m-calpains. *J. Biol. Chem.* 281, 35567–35575.
- Xu, L., and Deng, X. (2006b). Protein kinase Ciota promotes nicotine-induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of micro- and m-calpains. *J. Biol. Chem.* 281, 4457–4466.
- Xu, W., Wong, T.P., Chery, N., Gaertner, T., Wang, Y.T., and Baudry, M. (2007). Calpain-mediated mGluR1alpha truncation: a key step in excitotoxicity. *Neuron* 53, 399–412.
- Yakes, F.M., Chen, J., Tan, J., Yamaguchi, K., Shi, Y., Yu, P., Qian, F., Chu, F., Bentzien, F., Cancilla, B., et al. (2011). Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Mol. Cancer Ther.* 10, 2298–2308.
- Yamashima, T. (2013). Reconsider Alzheimer's disease by the "calpain-cathepsin hypothesis"—a perspective review. *Prog. Neurobiol.* 105, 1–23.
- Yamashima, T., and Oikawa, S. (2009). The role of lysosomal rupture in neuronal death. *Prog. Neurobiol.* 89, 343–358.
- Yamashima, T., Kohda, Y., Tsuchiya, K., Ueno, T., Yamashita, J., Yoshioka, T., and Kominami, E. (1998). Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on "calpain-cathepsin hypothesis." *Eur. J. Neurosci.* 10, 1723–1733.
- Yamashima, T., Tonchev, A.B., Tsukada, T., Saido, T.C., Imajoh-Ohmi, S., Momoi, T., and Kominami, E. (2003). Sustained calpain activation associated with lysosomal rupture executes necrosis of the postischemic CA1 neurons in primates. *Hippocampus* 13, 791–800.
- 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, 1630–1633.
- Yang, J., Dai, C., and Liu, Y. (2003). Hepatocyte growth factor suppresses renal interstitial myofibroblast activation and intercepts Smad signal transduction. *Am. J. Pathol.* 163, 621–632.
- Yang, J.J., Yang, J.H., Kim, J., Ma, S.H., Cho, L.Y., Ko, K.-P., Shin, A., Choi, B.Y., Kim, H.J., Han, D.S., et al. (2013). Soluble c-Met protein as a susceptible biomarker for gastric cancer risk: A nested case-control study within the Korean Multicenter Cancer Cohort. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 132, 2148–2156.
- Yano, S., Wang, W., Li, Q., Matsumoto, K., Sakurama, H., Nakamura, T., Ogino, H., Kakiuchi, S., Hanibuchi, M., Nishioka, Y., et al. (2008). Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res.* 68, 9479–9487.
- Yano, S., Yamada, T., Takeuchi, S., Tachibana, K., Minami, Y., Yatabe, Y., Mitsudomi, T., Tanaka, H., Kimura, T., Kudoh, S., et al. (2011). Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 6, 2011–2017.
- Yeo, T.T., Chua-Couzens, J., Butcher, L.L., Bredesen, D.E., Cooper, J.D., Valletta, J.S., Mobley, W.C., and Longo, F.M. (1997). Absence of p75NTR causes increased basal forebrain cholinergic neuron size, choline acetyltransferase activity, and target innervation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 7594–7605.
- Yo, Y., Morishita, R., Nakamura, S., Tomita, N., Yamamoto, K., Moriguchi, A., Matsumoto, K., Nakamura, T., Higaki, J., and Ogihara, T. (1998). Potential role of hepatocyte growth factor in the maintenance of renal structure: anti-apoptotic action of HGF on epithelial cells. *Kidney Int.* 54, 1128–1138.
- You, W.-K., Sennino, B., Williamson, C.W., Falcón, B., Hashizume, H., Yao, L.-C., Aftab, D.T., and McDonald, D.M. (2011). VEGF and c-Met Blockade Amplify Angiogenesis Inhibition in Pancreatic Islet Cancer. *Cancer Res.* 71, 4758–4768.
- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T., and Simon, H.-U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 8, 1124–1132.
- Yu, H.A., Arcila, M.E., Rekhtman, N., Sima, C.S., Zakowski, M.F., Pao, W., Kris, M.G., Miller, V.A., Ladanyi, M., and Riely, G.J. (2013). Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. *Clin. Cancer Res.* 19, 2240–2247.

- Yun, B., Lee, H., Ghosh, M., Cravatt, B.F., Hsu, K.-L., Bonventre, J.V., Ewing, H., Gelb, M.H., and Leslie, C.C. (2014). Serine Hydrolase Inhibitors Block Necrotic Cell Death by Preventing Calcium Overload of the Mitochondria and Permeability Transition Pore Formation. *J. Biol. Chem.* 289, 1491–1504.
- Zaffaroni, D., Spinola, M., Galvan, A., Falvella, F.S., Pazzaglia, S., Saran, A., Mancuso, M.T., Galbiati, F., Pignatiello, C., Cabrera, W., et al. (2005). Met proto-oncogene juxtamembrane rare variations in mouse and humans: differential effects of Arg and Cys alleles on mouse lung tumorigenesis. *Oncogene* 24, 1084–1090.
- Zatz, M., and Starling, A. (2005). Calpains and disease. *N. Engl. J. Med.* 352, 2413–2423.
- 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., et al. (2008). c-Met gene amplification is associated with advanced stage colorectal cancer and liver metastases. *Cancer Lett.* 265, 258–269.
- Zhang, Y., Schiff, D., Park, D., and Abounader, R. (2014a). MicroRNA-608 and microRNA-34a regulate chordoma malignancy by targeting EGFR, Bcl-xL and MET. *PLoS One* 9, e91546.
- Zhang, Y.-W., Su, Y., Lanning, N., Gustafson, M., Shinomiya, N., Zhao, P., Cao, B., Tsarfaty, G., Wang, L.-M., Hay, R., et al. (2004). Enhanced growth of human met-expressing xenografts in a new strain of immunocompromised mice transgenic for human hepatocyte growth factor/scatter factor. *Oncogene* 24, 101–106.
- Zhang, Z., Wang, J., Ji, D., Wang, C., Liu, R., Wu, Z., Liu, L., Zhu, D., Chang, J., Geng, R., et al. (2014b). Functional Genetic Approach Identifies MET, HER3, IGF1R, INSR Pathways as Determinants of Lapatinib Unresponsiveness in HER2-Positive Gastric Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 20, 4559–4573.
- Zheng, X., Zhou, A.-X., Rouhi, P., Uramoto, H., Borén, J., Cao, Y., Pereira, T., Akyürek, L.M., and Poellinger, L. (2014). Hypoxia-induced and calpain-dependent cleavage of filamin A regulates the hypoxic response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2560–2565.
- Zhu, D.M., and Uckun, F.M. (2000). Calpain inhibitor II induces caspase-dependent apoptosis in human acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma cells as well as some solid tumor cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6, 2456–2463.
- Zhu, Y., Li, Y., Haraguchi, S., Yu, M., Ohira, M., Ozaki, T., Nakagawa, A., Ushijima, T., Isogai, E., Koseki, H., et al. (2013). Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression. *J. Clin. Invest.* 123, 2935–2947.
- Zimmerman, U.J., Boring, L., Pak, J.H., Mukerjee, N., and Wang, K.K. (2000). The calpain small subunit gene is essential: its inactivation results in embryonic lethality. *IUBMB Life* 50, 63–68.
- (1999). Mutant Met-mediated transformation is ligand-dependent and can be inhibited by HGF antagonists. *Publ. Online* 16 Sept. 1999 Doi101038sjonc1202899 18.

ANNEXES

Le récepteur Met fête ses 30 ans : de la découverte d'un oncogène au développement de thérapies ciblées

Rémi Montagne, Alessandro Furlan, Zoulika Kherrouche et David Tulasne

CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille - Institut Pasteur de Lille - Université de Lille 1 – Université de Lille 2, SIRIC ONCOLille, IFR142, Lille 59021, France.

Mots-clés: Met, Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor, Cancer, Récepteur Tyrosine Kinase, Signalisation, Thérapie ciblée, Anniversaire

Résumé

En 1984, le récepteur tyrosine kinase (RTK) Met et son ligand, l'HGF/SF, sont découverts grâce à leur aptitude à induire la transformation et la prolifération cellulaire. Trois décennies ont permis de mettre en évidence leur rôle fondamental dans le développement et l'homéostasie de nombreuses structures, notamment des organes épithéliaux. Cette même période a permis de décrypter les bases structurales de leur interaction ainsi qu'un réseau de signalisation complexe. Parallèlement, l'implication de la dérégulation de Met dans la tumorigenèse, supposée dès sa découverte, a été démontrée et associée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers. Son implication dans des phénomènes de résistance aux thérapies actuelles commence également à être déchiffrée. Sur la base de ces données, des compagnies pharmaceutiques ont développé une grande diversité d'inhibiteurs ciblant l'HGF/SF ou Met, dont certains sont actuellement évalués dans des essais cliniques de phase III. Nous proposons dans cette revue de retracer le parcours exemplaire des recherches sur le récepteur Met, qui auront permis en trente ans de passer de la découverte fondamentale d'un oncogène au développement de thérapies ciblant son action. Cependant, de nombreuses questions restent en suspens. Par exemple, l'implication de Met dans plusieurs étapes du développement reste à préciser, de même que les mécanismes faisant de ce récepteur un facteur de résistance aux traitements actuels ou le développement probable de résistances aux thérapies ciblant sa propre activité.

Abstract

In 1984, the Met receptor and its ligand, the HGF/SF, were discovered thanks to their ability to induce cell transformation and proliferation. Thirty years of research highlighted their crucial role in the development and homeostasis of various structures, including many epithelial organs. This period also allowed unraveling the structural basis of their interaction and their complex signaling network. In parallel, Met was shown to be deregulated and associated to poor prognosis in numerous cancers. Met involvement in resistance to current therapies is also being deciphered. Based on these data, pharmaceutical companies developed a variety of Met inhibitors, some of which are in phase III clinical trials. In this review, we offer to trace the exemplary track record of research on Met receptor, which allowed moving from bench to bedside through development of therapies targeting its activity. Still many questions remain open such as the involvement of Met in several processes of development, as well as the mechanisms involving Met in resistance to current therapies or the likely appearance of resistances to Met-targeted therapies.

La découverte du couple HGF/SF-Met

En 1984, il y a tout juste 30 ans, C.S. Cooper et ses collaborateurs identifient l'oncogène TPR-Met à partir d'une lignée cellulaire traitée par un carcinogène chimique [1]. Cette protéine chimérique résulte d'un réarrangement chromosomique entre le gène *tpr* et le gène *met*, nommé ainsi d'après l'agent carcinogène utilisé, le N-méthyl-N'-nitrosoguanidine. La partie TPR entraîne la dimérisation et l'activation constitutive du domaine kinase de Met, responsable du caractère oncogénique de TPR-Met. En 1984, T. Nakamura et ses collaborateurs isolent, à partir de plasma de rats partiellement hépatectomisés, un facteur mitogène des hépatocytes, l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) [2]. En 1987, M. Stocker et ses collaborateurs identifient, à partir d'un surnageant de fibroblastes, un facteur induisant la dispersion des cellules épithéliales nommé Scatter Factor (SF) [3]. En 1991, il est montré que l'HGF et le SF sont une seule et même protéine, rebaptisée HGF/SF, capable de lier le récepteur Met [4].

Le couple HGF/SF-Met

L'HGF/SF est une protéine hétérodimérique de 90 kDa. Elle est composée d'une sous-unité α possédant un domaine N-terminal (domaine N) et quatre domaines en boucles (domaines kringle, K1 à K4) et d'une chaîne β présentant une forte homologie avec le domaine sérine protéase du plasminogène mais dénuée d'activité catalytique [5] (Fig. 1A).

Le récepteur Met est synthétisé sous la forme d'un précurseur de 170 kDa, glycosylé puis clivé en une chaîne α entièrement extracellulaire et une chaîne β transmembranaire reliées par des ponts disulfures [5]. La partie extracellulaire est constituée d'un domaine SEMA, à cheval sur les chaînes α et β , homologue à un domaine des sémaphorines, des protéines de guidage des axones. Son analyse par cristallographie révèle une organisation en 7 pales concentriques constituées de feuilletts β . S'ensuivent un domaine PSI, ainsi nommé en raison de son homologie avec certains domaines des plexines, des sémaphorines et des intégrines, puis quatre domaines homologues aux immunoglobulines baptisés IPTs [6]. La partie intracellulaire de Met porte le domaine tyrosine kinase, à la structure bilobée constituée de feuilletts β en N-terminal et d'hélices α en C-terminal [7] (Fig.1B).

L'HGF/SF lie la région extracellulaire du récepteur Met au niveau de deux sites: les domaines IPT3 et IPT4, liant le domaine N de l'HGF/SF avec une haute affinité, et le domaine SEMA, qui lie la chaîne β de l'HGF/SF avec une plus faible affinité. Une fois lié à Met, l'HGF/SF se dimérise *via* une interaction tête-bêche de ses domaines N et K1, induisant la dimérisation de Met [8] (Fig.1C). L'HGF/SF est également capable de s'associer à des glycoprotéines sulfatées, de type héparine, qui favoriseraient son oligomérisation et faciliteraient ainsi la dimérisation de Met.

Implication dans le développement embryonnaire et l'homéostasie épithéliale

L'activation de Met par l'HGF/SF induit une grande variété de réponses biologiques sur des cultures cellulaires, telles que la survie, la prolifération, la migration, la morphogenèse, l'angiogenèse

ou encore la croissance de neurites [5]. Ces propriétés sont toutes en accord avec le rôle du récepteur Met *in vivo*.

A l'échelle de l'organisme, le couple HGF/SF-Met est impliqué dans la mise en place et l'homéostasie de nombreux tissus. En effet, au cours de l'organogenèse, Met est détecté dans les cellules épithéliales d'un grand nombre d'organes épithéliaux (foie, reins, poumons...) alors que l'HGF/SF est exprimé par les cellules mésenchymateuses proches. Cette expression complémentaire suggère leur implication, *via* une action paracrine, dans la mise en place de ces organes. [9]. En outre, le récepteur Met est détecté dans des myoblastes du dermomoyotome et des cellules nerveuses comme les précurseurs des motoneurones, suggérant un rôle dans la mise en place de structures musculaires et nerveuses.

Dans les années 90, l'inactivation des gènes *hgf/sf* et *met* chez la souris permet de confirmer leur rôle crucial dans l'embryogenèse. Ainsi, des souris *met*^{-/-} ou *hgf/sf*^{-/-} meurent *in utero* à 15 jours de développement et présentent des phénotypes similaires, confirmant le lien fonctionnel entre l'HGF/SF et Met. Les embryons présentent un défaut d'organisation du trophoblaste labyrinthique du placenta, causant une réduction des échanges materno-fœtaux à l'origine de leur mort [10, 11]. Ils présentent également une réduction de la taille du foie, ainsi qu'une absence de muscles squelettiques dans les bourgeons des membres, le diaphragme et le sommet de la langue, liée à un défaut de prolifération et de migration de leurs précurseurs [11, 12] (Fig. 2).

A partir des années 2000, l'extinction conditionnelle de Met permet de détailler son rôle dans la mise en place de structures individuelles. Ainsi, son inactivation dans les poumons inhibe significativement le développement alvéolaire [13] et son extinction dans le système nerveux central induit la perte de sous-groupes de motoneurones [14] (Fig. 2).

Chez l'adulte, le couple HGF/SF-Met joue un rôle important dans la régénération des tissus épithéliaux. Une augmentation du taux d'HGF/SF est observable après lésion d'organes comme le foie, les reins ou la moelle épinière et l'administration d'HGF/SF favorise la régénération de ces tissus. Au contraire, la régénération du foie, de l'épiderme ou des reins est inhibée par l'extinction conditionnelle de Met dans ces tissus [15] (Fig. 2).

Décryptage des mécanismes moléculaires associés à l'activation de Met

La signalisation de Met commence à être décrite dès l'identification de son ligand en 1991. Suite à son interaction avec l'HGF/SF, Met se dimérise et s'autophosphoryle sur les résidus Y1234 et 1235 du domaine catalytique. Les résidus tyrosines 1349 et 1356 phosphorylés de la région C-terminales constituent quant à eux un « site d'ancrage multi-substrat » capable de lier de multiples effecteurs, tels que Gab1, Grb2, Shc, PI3K, Src, STAT3 ou PLC β (Figure 3). La mutation de ce site chez la souris induit des phénotypes similaires à ceux des souris Met^{-/-}, démontrant son rôle central dans la signalisation [16]. Suite au recrutement de ces adaptateurs, diverses cascades de signalisation sont enclenchées. Par exemple, l'activation des petites protéines G Ras, Rac et PAK contrôle le

réarrangement du cytosquelette et la motilité [17]. La voie PI3K, *via* l'activation d'Akt, joue aussi un rôle central dans la survie cellulaire induite par Met [18], tout comme la régulation de p53 par Abl et p38 [19].

Au cours des années 2000, différents mécanismes de régulation négative du récepteur Met sont mis en évidence. Ainsi, l'ubiquitination de Met, suite au recrutement de l'E3 Ubiquitin ligase Cbl par la tyrosine juxtamembranaire phosphorylée 1003, induit son endocytose, son transport vers l'endosome et sa dégradation [20]. La mutation de la Y1003 induit l'activation du récepteur et augmente ses capacités transformantes, soulignant l'importance de ce processus d'atténuation (Figure 3). D'autres sites de régulation siègent au niveau du domaine juxtamembranaire de Met, comme la Sérine 983, dont la phosphorylation par les PKC réprime son activité [21]. Ce domaine est également la cible de protéases. Ainsi, suite à un stress apoptotique, Met est clivé par les caspases en un fragment capable d'amplifier la perméabilisation mitochondriale et la mort cellulaire [22]. De par ses capacités pro-apoptotiques opposées à son activité anti-apoptotique en réponse au ligand, Met est classé parmi les récepteurs à dépendance (Figure 3). De plus, la demi-vie de Met est régulée par un premier clivage constitutif dans son domaine extracellulaire par des metalloprotéases de la famille ADAM, suivi d'un second clivage par la α -secrétase dans la région juxtamembranaire [23] (Figure 3).

L'internalisation de Met n'est pas uniquement synonyme de dégradation mais participe aussi activement à sa signalisation. Ainsi, en réponse à l'HGF/SF, Met se déplace avec le facteur de transcription STAT3 vers les endosomes péri-nucléaires. Ce trafic est impliqué dans la translocation nucléaire de STAT3 et son activité, importante notamment pour la transformation cellulaire induite par Met [24].

Le réseau social de Met

Les années 2000 voient Met nous dévoiler ses partenaires à la membrane plasmique, qui contribuent à son activation efficace. L'association entre Met et l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ est ainsi importante pour l'invasion cellulaire [25]. Met peut aussi interagir avec l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$, favorisant le recrutement de Gab1 et PI3K et le contrôle de la voie Wnt [26]. L'interaction de Met avec l'isoforme CD44v6 favorise quant à elle la phosphorylation de Met par son ligand mais aussi une activation plus efficace de la voie RAS-ERK, *via* l'association de la région intracellulaire de CD44v6 avec les protéines ERM (Ezrin, Radixine et Moesine) [27]. L'interaction de Met avec les récepteurs de type plexin stimule par ailleurs l'invasion ou l'angiogenèse induite par les sémaphorines [28]. Met peut aussi dialoguer avec d'autres récepteurs tyrosine kinase comme l'EGFR, ce qui est important dans différents cancers et sera discuté plus loin. Enfin Met peut interagir avec Fas, un récepteur de mort. L'HGF/SF peut provoquer la dissociation d'un complexe entre Met et Fas, sensibilisant ainsi les cellules à l'apoptose [29].

Mise en évidence des dérégulations du couple HGF/SF-Met dans les cancers

Les capacités du couple HGF/SF-Met à induire la survie, l'angiogenèse ou la motilité sont autant de propriétés pouvant contribuer à la tumorigenèse. Le lien formel entre l'activation aberrante de Met et le cancer a été établi en 1997 par l'identification de mutations de Met associées à l'apparition de carcinomes rénaux héréditaires [30]. Depuis, plus de 150 mutations somatiques ponctuelles de Met ont été répertoriées dans divers cancers (d'après le site COSMIC : Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer). La plupart des mutations du domaine catalytique favorise l'activité kinase permettant l'induction des voies de signalisation mais également le recyclage du récepteur au dépend de sa dégradation [31]. De façon cohérente, des souris transgéniques portant ces mutations développent de nombreux cancers [32, 33].

La surexpression de Met a été aussi largement observée et concerne jusqu'à 80% des cancers gastriques et rénaux [34, 35]. De nombreux mécanismes peuvent induire une telle surexpression. Outre l'existence d'amplifications géniques, différents oncogènes comme Ras, Ret ou Ets-1 augmentent sa transcription [36]. L'expression de Met est également réprimée par le microARN miR-34b, qui est régulé par p53 et pourrait donc relier l'inactivation de p53 à la surexpression de Met. L'activation aberrante de Met peut également résulter d'une surexpression de son ligand l'HGF/SF. De manière générale, la surexpression de l'HGF/SF ou de Met est de mauvais pronostic.

Un dernier élément et non le moindre dans le contexte des thérapies anti-cancéreuses réside dans les résistances aux thérapies ciblant l'EGFR dans les cancers du poumon et du colon suite à une surexpression de Met [37, 38]. L'activation de Met permet alors de compenser l'inhibition de l'EGFR, et ceci de manière d'autant plus efficace que les réseaux de signalisation des deux RTK sont très similaires.

Les stratégies thérapeutiques

Les stratégies d'inhibition de Met développées par les laboratoires pharmaceutiques et académiques visent soit à perturber l'interaction de l'HGF/SF avec Met à l'aide d'anticorps bloquants, soit à inhiber l'activité tyrosine kinase de Met à l'aide d'inhibiteurs de tyrosine kinases (TKI) (Fig. 3). Ces stratégies, en développement depuis le début des années 2000, ont clairement démontré leur efficacité dans des modèles pré-cliniques de cancers où Met est dérégulé. L'explosion du nombre d'essais mis en place ces trois dernières années, passant de 95 en 2011 à plus de 240 aujourd'hui témoigne de la confiance placée par l'industrie pharmaceutique dans le potentiel de ces nouvelles thérapies. Ces essais concernent 18 composés évalués en phases I et II et seuls 5 composés sont actuellement évalués en phase III (Fig. 4).

Les TKI dirigés contre Met sont en grande majorité des mimétiques de l'ATP, capables d'occuper la poche ATP du domaine kinase (Fig. 3). Le K252a, un alcaloïde naturel analogue de la staurosporine a été le premier inhibiteur ciblant Met identifié, mais il présente une faible sélectivité [39]. Rapidement d'autres compétiteurs de l'ATP cette fois plus spécifiques ont été développés

comme le PHA-665752 [40], encore largement utilisé en recherche. Aujourd'hui, une douzaine d'inhibiteurs spécifiques de Met sont évalués en essais de phase I/II, comme le JNJ38877605.

Les inhibiteurs les plus avancés dans leur développement sont des inhibiteurs à spectre d'action plus large. Le Crizotinib, un inhibiteur de Met, ALK (anaplastic lymphoma kinase) et ROS1 (c-ros oncogene 1) est ainsi prescrit chez les patients atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) présentant une translocation de ALK. La capacité du Crizotinib à inhiber également Met pourrait être un avantage puisqu'il permet à la fois de contrecarrer l'activation de ALK et de réduire les risques de résistances impliquant des amplifications de Met [41].

Le seul inhibiteur spécifique de Met dont l'efficacité est actuellement évaluée dans des essais de phase III est le Tivantinib. Toutefois, un premier essai de phase III arrêté prématurément en 2012 n'a pas permis de montrer l'efficacité d'une association du Tivantinib avec l'Erlotinib sur la survie globale de patients atteints de CBNPC. Cependant, une amélioration de la survie sans progression des patients dont la tumeur présente une surexpression et/ou amplification du gène Met a été constaté.

Les anticorps bloquant monoclonaux (monoclonal antibody, Mab) dont le développement a débuté en 1998 avec la mise au point du DN-30 [42], représentent une des stratégies les plus prometteuses. Ils sont dirigés contre l'HGF/SF ou la région extracellulaire du récepteur Met et empêchent leur interaction (Fig. 3). Par exemple, l'anticorps AMG102 (Rilotumumab), dirigé contre l'HGF/SF, est en cours d'évaluation dans un essai de phase III chez des patients atteints de cancers gastriques ou d'adénocarcinomes de la jonction œsophagienne qui surexpriment la protéine Met. Parmi les anticorps dirigés contre Met, le MetMab (Onartuzumab) est un anticorps monoclonal humanisé monovalent, pour lequel un seul bras de l'anticorps est utilisé dans le but de prévenir la dimérisation du récepteur. Cet anticorps empêche l'interaction avec l'HGF/SF en liant le domaine SEMA de Met et prévient la croissance tumorale de cellules cancéreuses stimulées par l'HGF/SF dans des modèles murins [43]. Cependant, le co-traitement Onartuzumab/Tarceva (TKI anti-EGFR), testé en phase III sur des patients atteints de CBNPC exprimant Met, a été arrêté prématurément puisqu'il n'apportait pas de bénéfice clinique. D'autres essais cliniques de phase III évaluant l'efficacité de cet anticorps sont encore en cours.

De façon intéressante d'autres Mab dirigés contre le domaine extracellulaire de Met ont une action inhibitrice sans interférer avec l'interaction ligand/récepteur. Par exemple, l'anticorps monoclonal DN30 favorise la dégradation de Met dans des modèles murins en activant son clivage par les metalloprotéases et le complexe γ -secrétase et réduit ainsi la croissance tumorale [44].

D'autres stratégies sont développées au niveau préclinique pour inhiber la signalisation HGF/SF-Met. Par exemple, des antagonistes capables de lier Met sans l'activer sont en cours de développement, comme des sous domaines de l'HGF/SF, inspirés du variant naturel NK2, capable de se fixer à Met sans induire son activation [45]. De la même façon des molécules antagonistes ont été développées en utilisant des sous-domaines de Met dans le but de créer des leurres pour l'HGF/SF. Ces sous-domaines, correspondant à la totalité de la région extracellulaire ou au domaine SEMA, sont

capables d'inhiber des réponses induites par l'HGF/SF et réduisent la croissance de tumeurs expérimentales [46].

Perspectives

En 1984, le récepteur Met et son ligand l'HGF/SF étaient découverts grâce à leur capacité à induire la transformation et la prolifération cellulaire. En trois décennies, le réseau de signalisation, nécessaire au développement embryonnaire et à la régénération d'organes épithéliaux, a été finement décrypté. Parallèlement, l'implication de la dérégulation de Met dans la tumorigenèse a été clairement mise en évidence et a été associée à un mauvais pronostic dans de nombreux types de cancers (www.vai.org/Met/). Sur la base de ces données, des compagnies pharmaceutiques ont développé des inhibiteurs qui pour certains sont en cours d'évaluation clinique. La question est souvent posée du temps nécessaire au passage d'une découverte fondamentale vers une application clinique. Pour le récepteur Met, 30 ans ont été nécessaires. Ce parcours est tout à fait représentatif de ceux d'autres RTK pour lesquelles des thérapies ciblées sont également en cours de développement (Fig. 5).

Cependant, il faut noter deux échecs récents en phase III d'essai clinique dans les CBNPC évaluant un TKI et un anticorps anti-Met en co-traitement avec un inhibiteur de l'EGFR. Pour ces deux études, les patients éligibles au traitement ont été sélectionnés sur la base de la surexpression de Met, soit environ la moitié des patients pour ces cancers. Or, une surexpression de Met n'est pas forcément synonyme d'activation et moins encore d'une sensibilité accrue aux traitements. Une réévaluation des biomarqueurs prédictifs de l'efficacité des traitements semble donc nécessaire. Par exemple, l'activation de Met pourrait être directement évaluée par une détection de sa phosphorylation détectable par immunohistochimie ou *via* l'expression de l'HGF/SF dans la tumeur ou dans le sérum. De plus, le dialogue entre Met et les autres récepteurs membranaires est loin d'être bien compris. Ces dialogues sont importants, comme le montrent les liaisons dangereuses qu'entretiennent Met et l'EGFR dans les CBNPC. Enfin, l'arrivée des thérapies ciblant Met ouvrent de nouvelles problématiques, à commencer par le développement de résistances, déjà illustré à partir de modèles cellulaires dans lesquels un traitement avec des anti-Met induit des résistances impliquant les suspects habituels comme KRAS [47]. Enfin, l'avènement des thérapies ciblant Met ne doit pas occulter les nombreuses questions qui restent à élucider. Par exemple, l'implication de Met dans le développement d'organes épithéliaux comme le poumon n'a été démontré que très récemment par le biais de modèles animaux élaborés. Il est probable que Met soit impliqué dans le développement et l'homéostasie d'autres organes pour lesquels des modèles peuvent être développés.

Références:

1. Cooper CS, Park M, Blair DG, *et al.* Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 1984; 311: 29-33.
2. 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: 1450-9.
3. Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 1987; 327: 239-42.
4. Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, *et al.* Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7001-5.
5. Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Woude GV. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 89-103.
6. Gherardi E, Youles ME, Miguel RN, *et al.* Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 12039-44.
7. Schiering N, Knapp S, Marconi M, *et al.* Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the hepatocyte growth factor receptor c-Met and its complex with the microbial alkaloid K-252a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 12654-9.
8. Gherardi E, Sandin S, Petoukhov MV, *et al.* Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 4046-51.
9. Andermarcher E, Surani MA, Gherardi E. Co-expression of the HGF/SF and c-met genes during early mouse embryogenesis precedes reciprocal expression in adjacent tissues during organogenesis. *Dev Genet* 1996; 18: 254-66.
10. Uehara Y, Minowa O, Mori C, *et al.* Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 1995; 373: 702-5.
11. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, *et al.* Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995; 373: 699-702.
12. Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, *et al.* Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 1995; 376: 768-71.
13. Calvi C, Podowski M, Lopez-Mercado A, *et al.* Hepatocyte growth factor, a determinant of airspace homeostasis in the murine lung. *PLoS genetics* 2013; 9: e1003228.
14. Lamballe F, Genestine M, Caruso N, *et al.* Pool-specific regulation of motor neuron survival by neurotrophic support. *J Neurosci* 2011; 31: 11144-58.
15. Huh CG, Factor VM, Sanchez A, *et al.* Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 4477-82.
16. Maina F, Casagrande F, Audero E, *et al.* Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* 1996; 87: 531-42.
17. Royal I, Lamarche-Vane N, Lamorte L, *et al.* Activation of cdc42, rac, PAK, and rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation. *Molecular biology of the cell* 2000; 11: 1709-25.

18. Moumen A, Ieraci A, Patane S, *et al.* Met signals hepatocyte survival by preventing Fas-triggered FLIP degradation in a PI3k-Akt-dependent manner. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2007; 45: 1210-7.
19. Furlan A, Stagni V, Hussain A, *et al.* Abl interconnects oncogenic Met and p53 core pathways in cancer cells. *Cell Death Differ* 2011; 18: 1608-16.
20. Peschard P, Fournier TM, Lamorte L, *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.
21. Hashigasako A, Machide M, Nakamura T, Matsumoto K. Bi-directional regulation of Ser-985 phosphorylation of c-met via protein kinase C and protein phosphatase 2A involves c-Met activation and cellular responsiveness to hepatocyte growth factor. *Journal of biological chemistry, The* 2004; 279: 26445-52.
22. Tulasne D, Deheuninck J, Lourenco FC, *et al.* Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 10328-39.
23. Ancot F, Leroy C, Muharram G, *et al.* Shedding-Generated Met Receptor Fragments can be Routed to Either the Proteasomal or the Lysosomal Degradation Pathway. *Traffic* 2012; 13: 1261-72.
24. Kermorgant S, Parker PJ. Receptor trafficking controls weak signal delivery: a strategy used by c-Met for STAT3 nuclear accumulation. *J Cell Biol* 2008; 182: 855-63.
25. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell* 2001; 107: 643-54.
26. Liu Y, Chattopadhyay N, Qin S, *et al.* Coordinate integrin and c-Met signaling regulate Wnt gene expression during epithelial morphogenesis. *Development* 2009; 136: 843-53.
27. Orian-Rousseau V, Morrison H, Matzke A, *et al.* Hepatocyte growth factor-induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44v6 and F-actin. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 76-83.
28. Sadanandam A, Rosenbaugh EG, Singh S, *et al.* Semaphorin 5A promotes angiogenesis by increasing endothelial cell proliferation, migration, and decreasing apoptosis. *Microvascular research* 2010; 79: 1-9.
29. Wang X, DeFrances MC, Dai Y, *et al.* A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol Cell* 2002; 9: 411-21.
30. Schmidt L, Duh FM, Chen F, *et al.* Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nature genetics* 1997; 16: 68-73.
31. Joffre C, Barrow R, Menard L, *et al.* A direct role for Met endocytosis in tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 827-37.
32. Jeffers M, Fiscella M, Webb CP, *et al.* The mutationally activated Met receptor mediates motility and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 14417-22.
33. Graveel C, Su Y, Koeman J, *et al.* Activating Met mutations produce unique tumor profiles in mice with selective duplication of the mutant allele. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 17198-203.
34. Ponzetto C, Giordano S, Peverali F, *et al.* c-met is amplified but not mutated in a cell line with an activated met tyrosine kinase. *Oncogene* 1991; 6: 553-9.
35. Natali PG, Prat M, Nicotra MR, *et al.* Overexpression of the met/HGF receptor in renal cell carcinomas. *International journal of cancer* 1996; 69: 212-7.
36. Ivan M, Bond JA, Prat M, *et al.* Activated ras and ret oncogenes induce over-expression of c-met (hepatocyte growth factor receptor) in human thyroid epithelial cells. *Oncogene* 1997; 14: 2417-23.

37. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, *et al.* MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007; 316: 1039-43.
38. Bardelli A, Corso S, Bertotti A, *et al.* Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer discovery* 2013; 3: 658-73.
39. Morotti A, Mila S, Accornero P, *et al.* K252a inhibits the oncogenic properties of Met, the HGF receptor. *Oncogene* 2002; 21: 4885-93.
40. Christensen JG, Schreck R, Burrows J, *et al.* 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* 2003; 63: 7345-55.
41. Gridelli C, Peters S, Sgambato A, *et al.* ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer treatment reviews* 2013.
42. Prat M, Crepaldi T, Pennacchietti S, *et al.* Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 2): 237-47.
43. Merchant M, Ma X, Maun HR, *et al.* Monovalent antibody design and mechanism of action of onartuzumab, a MET antagonist with anti-tumor activity as a therapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: E2987-96.
44. Foveau B, Ancot F, Leroy C, *et al.* Downregulation of the Met Receptor Tyrosine Kinase by Presenilin-dependent Regulated Intramembrane Proteolysis. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 2494-506.
45. Matsumoto K, Nakamura T, Sakai K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor and Met in tumor biology and therapeutic approach with NK4. *Proteomics* 2008; 8: 3360-70.
46. Coxon A, Rex K, Meyer S, *et al.* Soluble c-Met receptors inhibit phosphorylation of c-Met and growth of hepatocyte growth factor: c-Met-dependent tumors in animal models. *Molecular cancer therapeutics* 2009; 8: 1119-25.
47. Cepero V, Sierra JR, Corso S, *et al.* MET and KRAS gene amplification mediates acquired resistance to MET tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res* 2010; 70: 7580-90.

Légende des figures

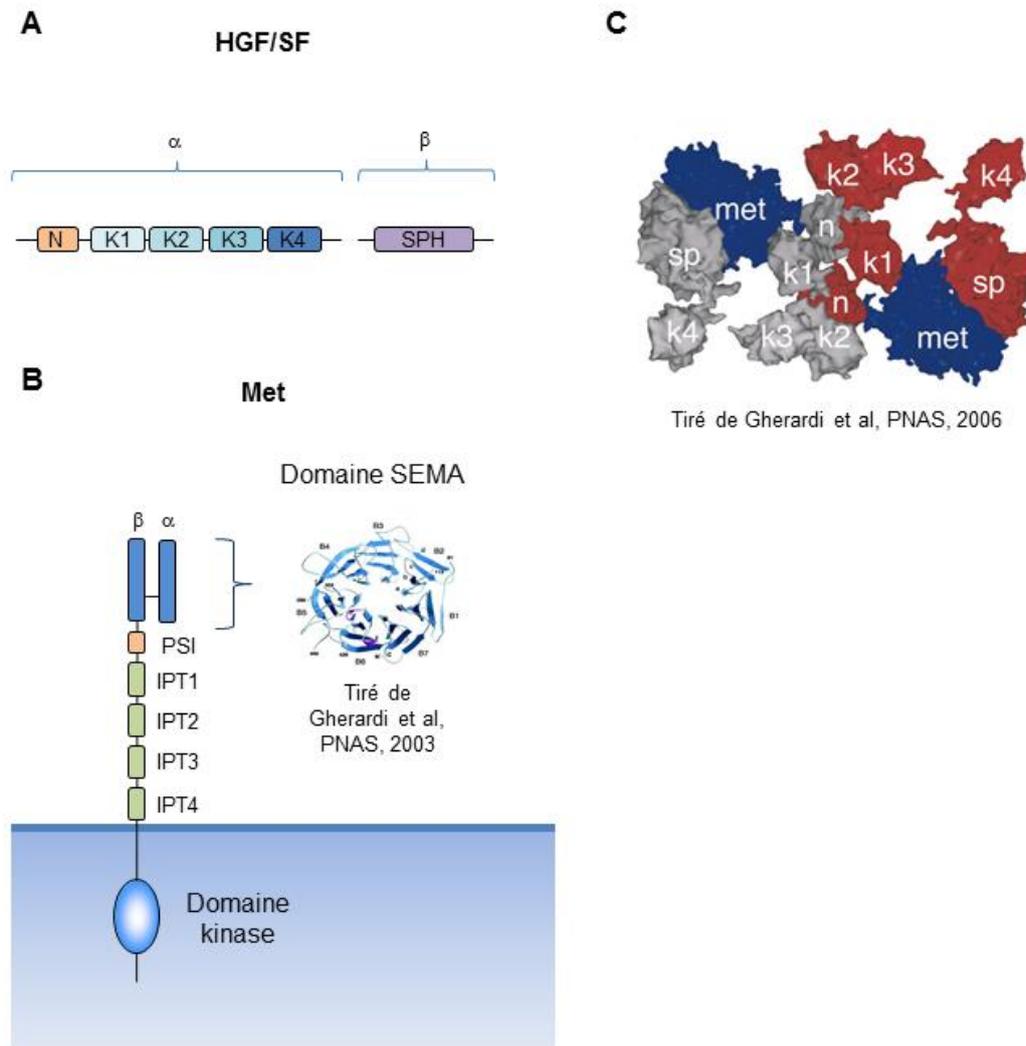


Figure 1 : Domaines fonctionnels et structure de Met et de son ligand l'HGF/SF

(A) L'HGF/SF est constitué de deux chaînes α et β reliées par des ponts disulfures. La sous-unité α possède un domaine N-terminal (domaine N) et quatre domaines baptisés « Kringles » de K1 à K4 en forme de boucles stabilisées par trois liaisons disulfures intra-chaînes. La chaîne β possède un domaine présentant une forte homologie avec le domaine sérine protéase du plasminogène (domaine SPH pour Serine Proteinase Homology). (B) Le récepteur Met est constitué de deux chaînes α et β reliées par des ponts disulfures. Sur sa partie extracellulaire, le récepteur est constitué d'un domaine SEMA, homologue aux sémaphorines, à cheval sur la chaîne α et β . Ce domaine est suivi d'une région riche en cystéine appelée domaine PSI pour son homologie avec des domaines retrouvés dans les Plexines, Sémaphorines et Intégrines. Puis la partie extracellulaire est constituée d'une succession de quatre domaines IPT (Immunoglobulin-like fold shared by plexins and transcription factors). La structure cristallographique du domaine SEMA révèle une organisation en 7 pales concentriques bâties à partir de feuillettes β . Met possède un domaine transmembranaire unique suivi dans la partie intracellulaire du domaine à activité tyrosine kinase [6]. (C) Structure cristallographique du domaine SEMA de Met avec l'HGF/SF. Deux molécules d'HGF/SF interagissent *via* leurs domaines N et K1 associés tête-bêche. Chaque molécule d'HGF/SF interagit avec un domaine SEMA de Met, permettant de proposer une interaction de type 2:2 (2 récepteurs, 2 ligands) entre Met et l'HGF/SF [8].

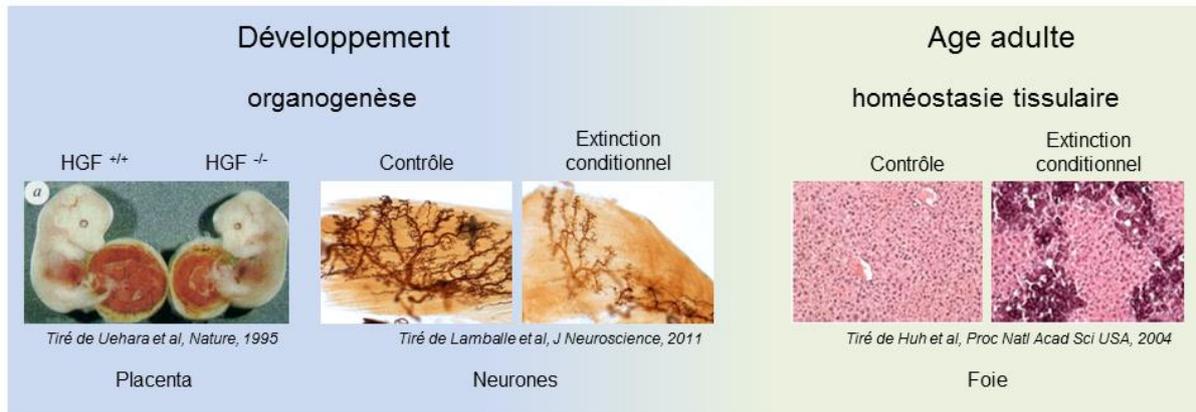


Figure 2 : Rôle de Met durant le développement et chez l'adulte

L'implication de l'HGF/SF et de Met durant le développement embryonnaire puis chez l'adulte a pu être démontré par l'inactivation de leur gène chez la souris. Ainsi, des animaux déficients pour Met ou l'HGF/SF (Met^{-/-} ou HGF/SF^{-/-}) meurent *in utero* à partir de 15 jours de développement. Des souris HGF/SF^{-/-} présentent des défauts d'organisation du trophoblaste labyrinthique du placenta et une réduction de la taille du foie [11]. L'extinction conditionnelle de Met spécifiquement dans le système nerveux empêche la survie d'un groupe de motoneurons innervant le muscle du petit pectoral [14], menant à des défauts moteurs. Enfin, son extinction conditionnelle chez l'adulte inhibe la régénération de tissus comme le foie [15].

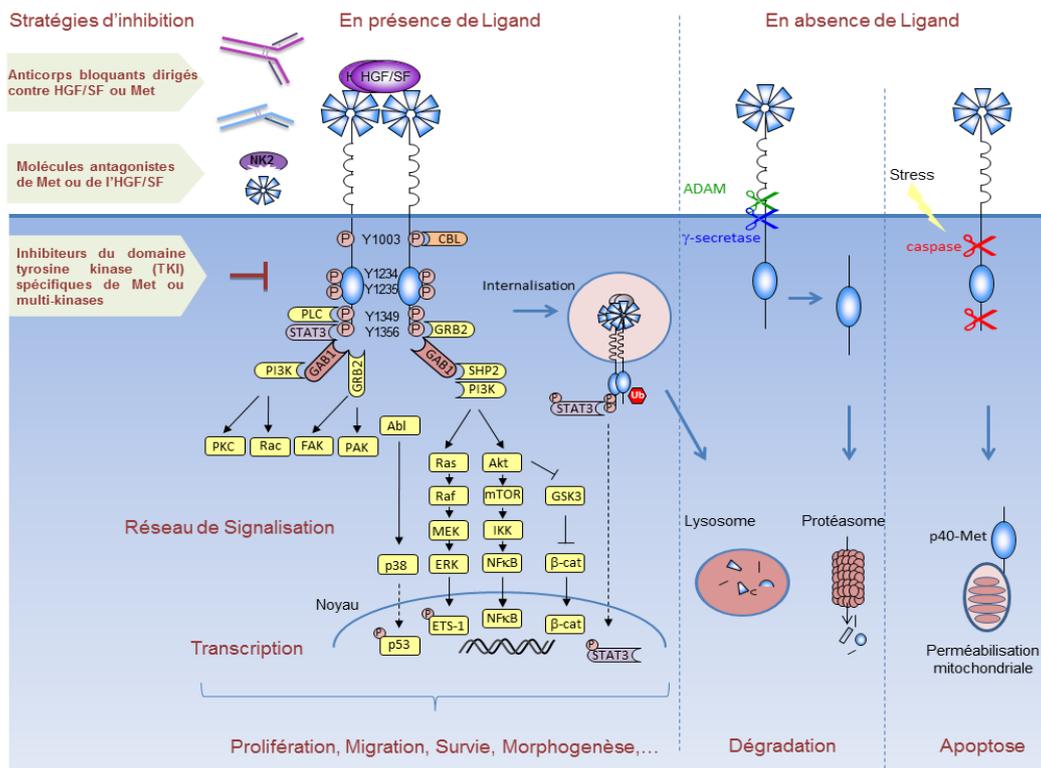


Figure 3 : Signalisation, dégradation et stratégies d'inhibition de Met

La fixation de son ligand, l'HGF/SF, provoque la dimérisation du récepteur Met et son autophosphorylation sur les résidus tyrosines Y1234 et 1235 du domaine kinase, participant à son activation, et les résidus tyrosines 1349 et 1356 de l'extrémité C-terminale constituant un « site d'ancrage multi-substrat ». Ce site est capable de lier de multiples effecteurs, comme GAB1, GRB2, PI3K ou STAT3, activant ainsi de multiples voies de signalisation intracellulaire dont l'intégration conduira aux différentes réponses biologiques induites par Met comme la prolifération, la survie, la migration ou la morphogénèse de branchement. Met s'autophosphoryle également sur la tyrosine 1003 du domaine juxtamembranaire, ce qui va induire le recrutement de CBL, une E3 Ubiquitin ligase, responsable de l'ubiquitinylation du récepteur. Le récepteur ubiquitinylé est endocyté, transporté vers l'endosome et finalement dégradé par le lysosome, contribuant ainsi à l'atténuation de la signalisation. D'autres sites de régulation négative siègent au niveau du domaine juxtamembranaire, dont divers sites de clivages par des protéases. Ainsi, Met subit un clivage constitutif dans son domaine extracellulaire par des metalloprotéases membranaires de la famille ADAM, puis dans la région juxtamembranaire par la γ -secrétase. Les fragments intracellulaires créés sont labiles puisqu'ils sont dégradés efficacement par le protéasome et le lysosome. Ces clivages sont impliqués dans la régulation de la demi-vie de Met. De plus, en absence de son ligand et suite à un stress apoptotique, Met est clivé par les caspases en un fragment capable d'amplifier la mort cellulaire par une action sur la perméabilisation de la mitochondrie.

Les stratégies d'inhibition de Met visent soit à interférer avec l'interaction HGF/SF-Met soit à inhiber l'activité tyrosine kinase de Met. Les inhibiteurs de l'interaction ligand-récepteur sont soit des anticorps bloquants monoclonaux spécifiquement dirigés contre l'HGF/SF ou contre la région extracellulaire de Met, soit des antagonistes capables de lier Met sans l'activer, comme les sous-domaines de l'HGF/SF inspirés du variant naturel NK2 ou encore des sous-domaines de Met utilisés comme leurres pour l'HGF/SF. Les inhibiteurs de l'activité kinase sont en grande majorité des mimétiques de l'ATP capables d'occuper la poche ATP de Met et d'inhiber son activité.

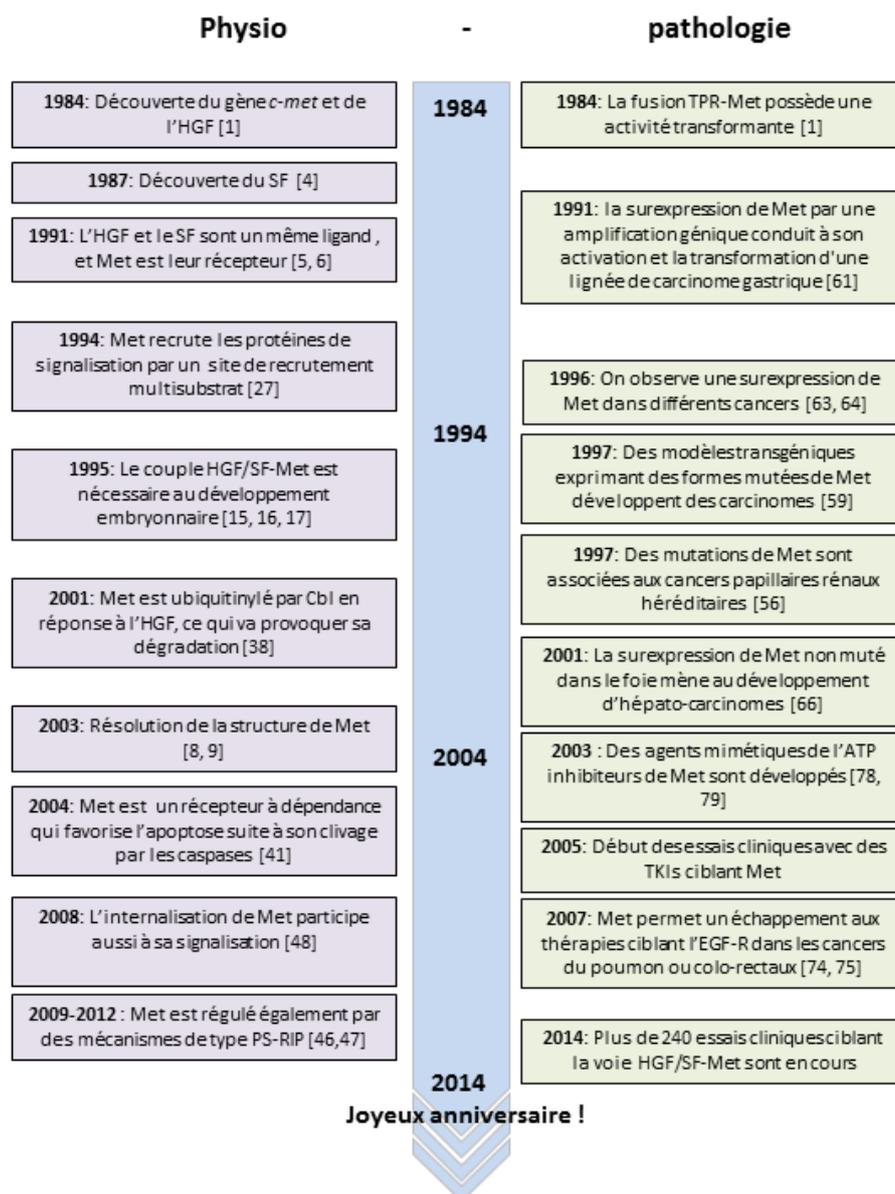


Figure 5 : Frise chronologique à partir de la découverte de Met jusqu'à aujourd'hui

Principales découvertes depuis 1984 à nos jours ayant permis de décrypter l'implication de Met dans les processus physiologiques, mais également dans les processus pathologiques comme les cancers.

Remerciements : Les travaux de recherche de l'équipe « Signalisation, Apoptose et Cancer » de l'UMR8161 sont soutenus par le CNRS, l'Institut Pasteur de Lille et l'INSERM et par des financements de la Ligue contre le Cancer, Comité Nord, de l'Association pour la Recherche sur le Cancer, de l'Institut National du Cancer, du Cancéropôle Nord-Ouest et du SIRIC ONCOLille.

30 years of research on Met receptor to move a biomarker from bench to bedside

Alessandro Furlan¹, Zoulika Kherrouche¹, Rémi Montagne¹, Marie-Christine Copin^{1,2} and David Tulasne¹

(1) CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille - Institut Pasteur de Lille - Université de Lille 1 – Université de Lille 2, SIRIC ONCOLille, 1 rue Pr Calmette, Lille 59021, France.

(2) Institut de Pathologie, CHR-U de Lille – Université de Lille 2, Avenue Oscar Lambret, Lille 59037, France.

Keywords: Met, Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor, Cancer, Receptor Tyrosine Kinase, Signaling, Targeted therapy, Anniversary

Running title: Met from bench to bedside

Corresponding author: David Tulasne, CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille - Institut Pasteur de Lille - Université de Lille 1 – Université de Lille 2, SIRIC ONCOLille, IFR142, 1 rue Pr Calmette, Lille 59021, France.

Acknowledgments

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 « Institut National du Cancer », the « Cancéropôle Nord-Ouest » and the « Site de Recherche intégrée sur le cancer de Lille, SIRIC ONCOLille ».

Abstract

Met receptor tyrosine kinase was discovered in 1984 as an oncogene. Thirty years later, Met and its ligand HGF/SF are promising targets for the novel therapies developed to fight against cancers, with more than 240 clinical trials currently conducted. In this review, we offer to trace and highlight the most recent findings of the exemplary track record of research on Met receptor, which allowed moving this biomarker from bench to bedside. Indeed, three decades of basic research unravelled the structural basis of the ligand/receptor interaction and their complex downstream signaling network. During this period, animal models highlighted their crucial role in the development and homeostasis of epithelial organs. In parallel, involvement of Met in tumorigenesis was confirmed by the direct association of its deregulation to poor prognosis in numerous cancers. Based on these data, pharmaceutical companies developed many Met inhibitors, some of which are in phase III clinical trials. These impressive achievements should not detract from many questions that still remain, such as the precise Met signaling involvement in development or homeostasis of specific epithelial structures. In addition, the processes involving Met in resistance to current therapies or the appearance of resistances to Met-targeted therapies are far to be fully understood.

Many phases II and III clinical trials are evaluating targeted therapies against Met in various types of carcinomas. It seems obvious nowadays that Met, like other RTKs, is a promising target in our fight against cancers. However, a long way of basic and applied research was necessary to place this RTK as a druggable actor of tumorigenesis. These multiple discoveries can be divided into three main steps: (i) Met physiological role and its downstream signaling pathways, (ii) its involvement in tumorigenesis, and (iii) the design and evaluation of the targeted therapies against it.

Step 1: Met physiological role and its downstream signaling pathways

Discovery of HGF/SF and Met

The Met receptor and the hepatocyte growth factor (HGF), its high affinity ligand, were both discovered in 1984. Met was characterized from the TPR-Met oncogene in the human osteosarcoma cell line HOS treated by a carcinogen. This fusion protein results from the rearrangement between the *tpo* gene and a novel gene, *met*, named in reference to the carcinogen used, the N-methyl-N'-nitrosoguanidine (1). The TPR part of fusion proteins induces their constitutive dimerization and thus activation of Met kinase domain, resulting in transforming activity. The Hepatocyte Growth factor (HGF) was isolated from the plasma of rats as a mitogen for cultured hepatocytes (2). Three years later, Stocker *et al.* identified a factor inducing epithelial cells scattering in fibroblast conditioned media so called Scatter Factor (SF) (3). In 1991, HGF and SF were recognized as the same protein encoded by the same gene and inducing similar biological responses through binding to the Met receptor (4).

HGF/SF is synthesized as an inactive pro-HGF matured by a proteolytic cleavage, leading to generation of an active 90kDa heterodimer consisting of an α and a β subunit bound by disulfide bridges. The α subunit includes an N-terminal (N) and four *kringle* (K1-K4) domains when the β subunit consists of a Serine Protease Homology (SPH) domain. Although SPH domain lacks enzymatic activity, a zymogen activator peptide selectively able to bind the activation pocket within the serine protease-like β -chain induces activation of pro-HGF-dependent Met signaling, suggesting that the protease like structure of HGF/SF plays a crucial role in its activation (5). Met is synthesized as a 170kDa precursor matured into a heterodimeric receptor composed of an extracellular α subunit linked to a single-pass transmembrane β subunit by a disulfide bond. The extracellular part of Met contains a N-terminal SEMA domain (also found in semaphorins, axon guidance proteins) encompassing the α subunit and the first amino acids of the β subunit, followed by a PSI domain (named from its presence in plexins, semaphorins and integrins) and 4 immunoglobulin-like domains called IPTs (Figure 1A). The crystal structure of Met extracellular region, resolved in 2003, showed the SEMA domain organized in a seven bladed β -propeller followed by stalk shaped PSI and IPTs domains (6). The intracellular region contains the tyrosine kinase domain and a C-terminal tail necessary to recruit signaling proteins following Met activation by HGF/SF binding (7).

Met has two binding sites for HGF/SF: the IPT3 and IPT4 domains bind the N domain of HGF/SF and the SEMA domain binds SPH domain of HGF/SF. HGF/SF dimerizes *via* top and tail interactions of N and K1 domains, resulting in Met dimerization (8) (Figure 1B). HGF/SF can also bind to sulphate glycoproteins, like heparins, which improve its oligomerization and thus Met dimerization.

HGF/SF-Met involvement in development and tissues homeostasis

Upon HGF/SF binding, Met can induce various biological responses, including proliferation and motility, at the origin of their discovery, but also, survival, morphogenesis, angiogenesis or neurite growth. All these effects are consistent with their role *in vivo*. Indeed, description of HGF/SF and Met expression patterns suggested from early 90s their importance in formation and homeostasis of numerous tissues. At the early stages of development, HGF/SF and Met display a concomitant expression in endoderm and mesoderm and likely act in an autocrine fashion. From organogenesis, Met is detected in epithelial cells of many organs (liver, kidney, lung, skin) whereas HGF/SF is expressed by adjacent mesenchymal cells. This complementary expression suggests that HGF/SF contributes in a paracrine fashion to epithelial organs development (9). Besides, Met is expressed in some myoblasts and neuronal precursors, suggesting a role in setting of muscular and nervous structures as well.

During the same decade, knockout mice confirmed HGF/SF and Met crucial role in embryogenesis, since *met* and *hgf/sf*-null mice die *in utero* at E15 and express similar phenotypes, confirming their functional link. Organization defect of the placental labyrinth, responsible for impaired exchanges between maternal and fetal blood, explains such lethality (10,11). Embryos also display reduced liver size, a consequence of decreased cell survival and proliferation and a lack of muscles in limbs, diaphragm and tongue resulting from the impaired migration of myogenic precursors. In the last years, conditional Met knock-out provided additional information about its role in the formation of individual structures. Thus, Met invalidation in lung severely impairs airspaces formation (12) and its extinction in central nervous system induces loss of motor neurons innervating pectoral muscles (13) (Figure 1 C and D). In adult, Met is crucial for epithelial tissues homeostasis since conditional Met invalidation impairs regeneration of liver, kidney or skin (14). On the contrary, injury of kidney, spinal cord or liver is followed by a rise in HGF/SF and its ectopic addition favors their regeneration.

Met and downstream signaling pathways' activation

Met receptor signaling began to be described from the early 90s, shortly after its identification as the receptor for HGF/SF. Met interaction with its ligand favors its dimerization and its

autophosphorylation on two tyrosine residues in its catalytic domain (Y1234 et 1235). Other tyrosine residues located outside the kinase domain are then phosphorylated, notably tyrosine 1003 in the juxtamembrane domain and tyrosines 1349 et 1356 at the C-terminal tail. Those latter residues are able to bind many effectors, such as Gab1, Grb2, Shc, PI3K, Src, STAT3 or PLC β . This multi-substrate docking site plays a key role in Met-induced biological responses, since its mutation in mice triggers phenotypes similar to those of Met-deficient mice (15).

Following the recruitment of these various adaptors by Met, several signaling cascades will be triggered via other downstream proteins, which can be associated to biological responses. For instance, small G proteins such as Ras, Rac, p21-activated kinase (PAK) and RAP1 control the cytoskeletal rearrangement and motility in response to HGF/SF (16). With regard to PI3K, its activation is involved in motility, but also plays a key role in cell survival *via* Akt activation (17). Met is also able to orientate p53 activity towards survival *via* a cascade implying Abl and p38-MAPK (18).

Met internalization and cleavages : beyond degradation

Since 2000, various mechanisms negatively regulating Met have been evidenced. Met auto-phosphorylation on Y1003 leads to Cbl E3 Ubiquitin ligase recruitment and to Met ubiquitinylation. Met receptor is then internalized and degraded (19). Y1003 mutation promotes Met activation and transforming capacities, highlighting the importance of this attenuation process.

Other negative regulation sites lie in the juxtamembrane domain, such as Serine 983, whose phosphorylation by protein kinases C down-regulate Met activity (20). This domain also contains several cleavage sites by proteases. In absence of its ligand and under stress conditions, Met is thus cleaved by caspases into an active fragment able to amplify cell death by favoring mitochondrial permeabilization (21). Via this pro-apoptotic potential opposed to its anti-apoptotic activities in response to its ligand, Met belongs to the dependence receptor family. Met is also submitted to a constitutive cleavage in its extracellular domain by ADAM family metalloproteinases, followed by a second cleavage by α -secretase in its juxtamembrane domain (22). The so-created intracellular fragments then undergo proteasomal and lysosomal degradations, which participate to the regulation of the receptor half-life.

Met internalization is not only synonymous of degradation but also actively participates to its signaling. Indeed, along its trafficking from early to peri-nuclear endosomes, Met co-localizes with STAT3 transcription factor and allows its proper nuclear translocation and transcriptional activities, involved in Met-induced morphogenesis and cellular transformation (23).

Met social network

During the last decade, Met unveiled to us its multiple partners at the plasma membrane, required for an efficient activation of signaling pathways. Met interaction with α 6 β 4 integrin is thus important for cellular invasion in response to HGF/SF (24). Met can also associate with α 3 β 1 integrin, which contributes to Gab1 and PI3K recruitment and results in the control of Wnt pathway (25). CD44v6 isoform interaction with Met not only promotes HGF-induced Met phosphorylation but also a more efficient activation of the Ras-MAPK pathway *via* the association between CD44v6 intracellular part and ERM proteins (Ezrin, Radixin and Moesin) (26). On the other side, the interaction of Met with plexin-type receptors favors invasion or angiogenesis induced by semaphorin

4D or 5A respectively (27). Recently, it has been shown that activated Met/tensin-4 interaction favors receptor stability and downstream signaling. Their correlated expression in colon and ovarian carcinoma suggests that TNS4 plays a critical role in Met stability in these cancers (28). Met can also hold a dialogue with other RTKs such as EGFR, which is especially relevant in tumor cells; this notion will be developed later in this review. Altogether, these data highlight how Met action is highly dependent on its relationships with other membrane partners, and such interactions should probably be taken into account when elaborating Met-targeting therapies.

Step 2: Met involvement in tumorigenesis

HGF/SF-Met abilities to induce proliferation, protection from apoptosis, angiogenesis and motility are nothing better than many properties potentially contributing to tumorigenesis. Met oncogenic role was initially evidenced in experimental systems, starting from Met discovery in a screening for cellular transformation. The formal link between Met aberrant activation and cancer development in humans was established a bit more than a decade later, with the identification of Met mutations associated with hereditary renal papillary carcinomas (29). Since then, more than 150 somatic point mutations in *met* sequence have been evidenced in various cancers (source COSMIC: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer). Some of these mutations activate the kinase domain, favor its ligand-induced activation or induce Met recycling at the membrane (30). Consistently, transgenic mice harboring Met mutations in the kinase domain develop several types of cancers (lymphomas, carcinomas and sarcomas) (31).

Met overexpression is also detected in various cancers and can affect up to 80% of patients suffering from gastric or renal cancers and usually correlates with a poor prognosis (32). Many mechanisms can be involved in Met overexpression. Beyond gene amplification, several oncogenes such as Ras, Ets-1 or Pax-5 increase Met transcription (33,34) (Figure 1 E and F). Met expression is also repressed by microRNAs (miRNAs) such as miRNA-34b, which is controlled by p53 and could link p53 inactivation frequently found in cancers with Met overexpression.

Met aberrant activation can also result from an overexpression of its ligand HGF/SF, which was notably observed in breast, gastric, colon or lung cancers and associated with a poor prognosis (35). Moreover, recent studies have highlighted a key role for HGF/SF secreted from the tumor microenvironment in the development of drug resistance, especially to RAF inhibitors (36).

Last but not least with regard to anticancerous therapies, Met overexpression has been observed in response to EGFR targeting drugs, such as Gefitinib in lung cancers (37) or cetuximab in colo-rectal cancers (38). The activation by Met of downstream signaling pathways actually allows to compensate for EGFR inhibition, especially since signaling networks controlled by EGFR and Met display many similarities. Thus, HGF/SF-Met deregulation has demonstrated to play a key role not only in the development of many cancers, but also in drug resistance mechanisms implemented by tumor cells.

Step 3: Design and evaluation of targeted therapies against Met

Inhibition of the HGF/ Met signaling pathway appeared as an obvious therapeutic strategy since the beginning of 2000. Preclinical experiments assessed the therapeutic potential of two approaches that aimed at disturbing the physical interaction between the Met receptor and its HGF/SF ligand using blocking antibodies, or inhibiting the kinase activity of the receptor using small-molecule tyrosine kinase inhibitors (TKI) (Fig. 1H). The level of confidence placed by the pharmaceutical groups in these strategies is highlighted by the number of clinical trials launched these last years with 95 trials

registered in www.clinicaltrials.gov in 2011 to more than 240 in 2014. These trials, mainly phase I/II, evaluate the safety and therapeutic potential of 23 different compounds and interestingly 5 compounds already made it to a phase III trial.

Met inhibitors are essentially ATP mimetics that compete with the ATP for access to the kinase active site then blocking the receptor activity. The first developed Met inhibitor, K252a, a staurosporine analog, displays a weak selectivity as it inhibits multiple kinases (39). It was rapidly replaced by more specific ATP competitors such as PHA-665752 (40), still widely used in basic research. Tivantinib is the sole Met specific TKI currently in phase III efficacy evaluation. Although the first phase III trial was prematurely terminated in 2012 due to a lack of clinical benefit in patients with NSCLC compared to a Tivantinib and Erlotinib association (EGFR-targeting TKI), an improvement of progression-free survival of patients with Met-positive tumors was reached. Therefore, additional phase III trials are ongoing taking into account the Met expression status of the targeted tumors.

Other Met inhibitors with a broader spectrum of action are in their later stage of drug development or even approved by the drug regulatory authorities. For instance, Crizotinib, an inhibitor of Met, ALK and ROS1 kinases was approved for patients with NSCLC harboring ALK translocations. Its efficacy to inhibit multiple kinases is probably a major asset to prevent the development of drug resistance particularly due to Met gene amplification (41). Moreover, encouraging preliminary results were obtained in patients with Met-positive gastroesophageal adenocarcinoma, thus predicting a more extensive clinical use of the TKI (42).

Development of monoclonal blocking antibodies, which started in 1998, is another promising strategy to inhibit the HGF/Met pathway. Directed against the ligand or the extracellular domain of the receptor, they prevent the HGF/Met interaction. As an example, AMG102/Rilotumumab, an anti-HGF antibody, is under evaluation in a phase III trial for patients with Met overexpression advanced gastric or esophageal junction carcinomas.

Against Met, the monoclonal humanized antibody MetMab/Onartuzumab, was originally designed with only one arm in order to prevent the receptor dimerization responsible for its auto-activation. Crystal structure revealed that Onartuzumab binds the Met SEMA domain, blocking the interaction with HGF/SF α chain (43). Despite encouraging results obtained in preclinical xenograft models and in a phase II trial in NSCLC with an Onartuzumab plus Erlotinib co-treatment (44), the clinical future of the antibody is uncertain. Indeed, the phase III trial for this co-treatment in patients with advanced NSCLC Met-positive was stopped prematurely for futility.

Interestingly, other Mabs directed against the extracellular domain of Met exert their inhibitory action without interfering with the ligand-receptor interaction. DN30 monoclonal antibody, for example, favors Met degradation in mouse models by activating Met cleavages by metalloproteases and α -secretase complex, thus reducing the tumor growth (45,46).

At a preclinical level, additional strategies to inhibit the HGF/Met signaling are inspired from the natural HGF/SF variant NK2, an antagonistic molecule capable of binding Met without activating it (Fig. 1H). For instance, NK4 constructed with the N and first four K domains of HGF/SF, inhibits tumorigenesis and angiogenesis in mouse models (47). Similarly, antagonistic molecules corresponding to Met extracellular region or to subdomains (ie: SEMA), are developed to generate an HGF/SF decoy (48).

Preclinical models already anticipate potential mechanisms of resistance against Met targeted therapies. An increased *met* gene copy number has thus been highlighted in cancer cells resistant to monovalent DN30 antibody (49), as well as *met* and *KRAS* amplification mediating acquired resistance to Met TKIs (50). Another study has evidenced that activation of HER family members allowed the resistance to PHA665752 (51), mirroring the role of Met in the resistance to EGFR targeted therapies, probably due to the high similarity between signaling networks downstream these receptors. Finally, in mice models and cell cultures, acquired resistance to Crizotinib involved a mutation in the Met kinase activation loop which could alter interaction with the TKI (52). Two other key aspects to consider in the emergence of cancer resistance to targeted therapies are the preexistence and selection by the treatments of clones harboring gene amplifications (53) and the role of environmental growth factors in innate and acquired resistance to kinase inhibitors (54).

With this in mind, one can try to think about the last failures of phase III clinical trials with Met-targeting agents Onartuzumab and Tivantinib. Both treatments did not meet their primary endpoint of increasing the overall survival of NSCLC patients in combination with Erlotinib, although they had shown strong efficiency in preclinical studies of mice xenografts with autocrine or paracrine HGF-Met stimulation loops. One may first reflect about the patients recruited in the trials, which were in their 2nd or 3rd line of treatment, thus meaning that previous treatments may have promoted the emergence of resistant clones. New phase III trials are ongoing, with Tivantinib proposed in monotherapy as a 2nd line treatment in hepatocellular carcinomas, and with Onartuzumab +/- Erlotinib as a first-line treatment in NSCLCs, which may improve their therapeutic efficacy. Moreover it has to be noted that NSCLCs represent tumors in which Met is overexpressed in nearly half of the patients as evaluated by immunohistochemistry (IHC). However, this overexpression does not necessarily mean that Met is activated in these tumors, thus leading to an overestimation of likely responders. Met phosphorylation, notably in its kinase domain, better reflects Met activation. Several specific antibodies recognizing Met tyrosine phosphorylation can be used by immunohistochemistry (Fig. 1G), and it has been shown that only about 5% of the NSCLC display Met tyrosine phosphorylation while receptor overexpression is much higher (55). Nevertheless, the stability of these phosphorylation sites *ex vivo* may require particular care for a routine use in clinic. HGF/SF status in human lung cancer patients represents another key biological feature which is so far not exploited but should prove to be useful, especially for strategies aimed at interfering with the interaction ligand-receptor. It has also recently been evidenced that Met mutations in the exon 14 are more frequent than originally thought in NSCLCs (56). The impact of Met-targeted therapies on cells bearing this kind of alteration has to be determined.

Results of ongoing clinical trials revealed this year at the ASCO meeting suggest that *met* gene amplification could be as well a good predictive biomarker. NSCLC patients displaying *met* gene amplification with a ratio of 5 or more *met* gene copies per cell were thus prospectively selected for a

phase I clinical trial evaluating Crizotinib (Met and ALK inhibitor). Crizotinib induced an objective response rate in about two thirds of this restricted subgroup (57). Similar promising responses on *met* amplified patients were reported also for Met inhibitor AMG337 in gastric cancer (58). These studies should be now strengthened from larger initial cohorts in order to have more patients displaying *met* gene amplification.

Altogether, these data suggest that selecting the right patients is critical to get successful Met-targeted therapies. A multiplexed molecular diagnostic of Met/HGF status may be required to identify those tumors in which Met represents an Achilles's heel. From that point of view, the stratified analysis of last phase III trials is expected with much impatience, in order to understand whether Met status and accompanying genetic alterations can retrospectively identify subpopulations responsive or refractory to such treatments. At the same time we can envision that different Met-targeted therapies may profit to distinct patient populations.

Perspectives

The question is frequently asked about the time necessary to move a biomarker from bench to bedside. This time highly depends on the nature of the target. Abl inhibition with drugs such as Gleevec took four decades from the observation of Philadelphia chromosome, the identification of bcr-abl fusion product in the early 80s, to the development of clinical drugs (For review see (59)). The huge progresses made since then in the field of molecular biology should help fastening the transition from bench to bedside. Anyhow, some promising targets are still waiting for therapeutical drugs. For example, Myc ubiquitous expression in most proliferating cells raise toxicity issues, and strategies to disrupt Myc-Max interaction are hindered by the large and relatively featureless surface of interaction (for review, see (60)). In parallel, RAS mutations in cancers were discovered nearly at the same time as was Met, but their therapeutical targeting was so far limited by the high affinity of GTP to RAS at picomolar levels. By contrast, ALK rearrangements in NSCLCs benefited from the previous clinical development of Crizotinib as a Met inhibitor (but it also inhibits ALK) to become biomarkers and targets of efficient Crizotinib treatments only 3 years after their discovery.

For Met, 30 years separate its discovery in 1984 to the actual promising clinical trials. In three decades, the signaling network required for embryonic development and epithelial organs regeneration, was finely decorticated. In parallel, Met deregulation in tumorigenesis was fully demonstrated and associated with a poor prognosis in numerous cancers (www.vai.org/Met/). Then pharmacological inhibitors were rapidly designed and the first administration to human begun in 2005. Nowadays two multiple TKI are already prescribed and a few Met specific inhibitors are currently under clinical testing. These impressive achievements should not, however, detract from the work that still remains. Indeed, fundamental research is still fuelling our knowledge of Met. For instance, the importance of Met relationships with other membrane proteins has been again evidenced recently with the involvement of tensin-4 in Met stabilization and transformation, or by the “liaisons dangereuses” between Met and EGFR in lung cancers. Moreover, even if Met role in development has been well

documented for almost 20 years, its involvement in lung alveolar formation or in specific muscle innervation was demonstrated only recently. The use of conditional animal models will more than likely lead to the identification of Met participation to the development and cell homeostasis of other organs.

With regard to signaling mechanisms, despite huge progresses made in the last decade, Met signaling networks are still far from being fully elucidated in the various settings in which Met is involved. Moreover, a new paradigm is emerging with the identification of distinct phenotypes elicited whether Met is activated via its overexpression or by the binding of its ligand (61). All these novel insights in Met action will probably lead to a better understanding of Met complex activity in cancers. This should help to refine therapeutic strategies and to overcome the development of resistance to Met targeting agents, already illustrated in cellular models.

The combined efforts which have allowed moving Met from the bench to the bedside in 30 years will now meet the challenges of identifying the most efficient therapeutic window and limiting the development of resistance to Met-targeted therapies.

References:

1. Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, et al. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 1984;311(5981):29-33.
2. 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(3):1450-9.
3. Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 1987;327(6119):239-42.
4. Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, Vandekerckhove J, Weingart S, Rieder H, et al. Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(16):7001-5.
5. Landgraf KE, Steffek M, Quan C, Tom J, Yu C, Santell L, et al. An allosteric switch for pro-HGF/Met signaling using zymogen activator peptides. *Nature chemical biology* 2014.
6. Gherardi E, Youles ME, Miguel RN, Blundell TL, Jamele L, Gough J, et al. Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100(21):12039-44.
7. Schiering N, Knapp S, Marconi M, Flocco MM, Cui J, Perego R, et al. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the hepatocyte growth factor receptor c-Met and its complex with the microbial alkaloid K-252a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100(22):12654-9.
8. Gherardi E, Sandin S, Petoukhov MV, Finch J, Youles ME, Ofverstedt LG, et al. Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(11):4046-51.
9. Andermarcher E, Surani MA, Gherardi E. Co-expression of the HGF/SF and c-met genes during early mouse embryogenesis precedes reciprocal expression in adjacent tissues during organogenesis. *Dev Genet* 1996;18(3):254-66.
10. 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;373:702-05.
11. 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(6543):768-71.
12. Calvi C, Podowski M, Lopez-Mercado A, Metzger S, Misono K, Malinina A, et al. Hepatocyte growth factor, a determinant of airspace homeostasis in the murine lung. *PLoS genetics* 2013;9(2):e1003228.
13. Lamballe F, Genestine M, Caruso N, Arce V, Richelme S, Helmbacher F, et al. Pool-specific regulation of motor neuron survival by neurotrophic support. *J Neurosci* 2011;31(31):11144-58.
14. Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(13):4477-82.

15. Maina F, Casagrande F, Audero E, Simeone A, Comoglio PM, Klein R, et al. Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* 1996;87(3):531-42.
16. Royal I, Lamarche-Vane N, Lamorte L, Kaibuchi K, Park M. Activation of cdc42, rac, PAK, and rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation. *Molecular biology of the cell* 2000;11(5):1709-25.
17. Moumen A, Ieraci A, Patane S, Sole C, Comella JX, Dono R, et al. Met signals hepatocyte survival by preventing Fas-triggered FLIP degradation in a PI3k-Akt-dependent manner. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2007;45(5):1210-7.
18. Furlan A, Stagni V, Hussain A, Richelme S, Conti F, Prodosmo A, et al. Abl interconnects oncogenic Met and p53 core pathways in cancer cells. *Cell Death Differ* 2011;18(10):1608-16.
19. 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(5):995-1004.
20. Hashigasako A, Machide M, Nakamura T, Matsumoto K. Bi-directional regulation of Ser-985 phosphorylation of c-met via protein kinase C and protein phosphatase 2A involves c-Met activation and cellular responsiveness to hepatocyte growth factor. *Journal of biological chemistry*, The 2004;279(25):26445-52.
21. 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(23):10328-39.
22. Ancot F, Leroy C, Muharram G, Lefebvre J, Vicogne J, Lemiere A, et al. Shedding-Generated Met Receptor Fragments can be Routed to Either the Proteasomal or the Lysosomal Degradation Pathway. *Traffic* 2012;13(9):1261-72.
23. Kermorgant S, Parker PJ. Receptor trafficking controls weak signal delivery: a strategy used by c-Met for STAT3 nuclear accumulation. *J Cell Biol* 2008;182(5):855-63.
24. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell* 2001;107(5):643-54.
25. Liu Y, Chattopadhyay N, Qin S, Szekeres C, Vasylyeva T, Mahoney ZX, et al. Coordinate integrin and c-Met signaling regulate Wnt gene expression during epithelial morphogenesis. *Development* 2009;136(5):843-53.
26. Orian-Rousseau V, Morrison H, Matzke A, Kastilan T, Pace G, Herrlich P, et al. Hepatocyte growth factor-induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44v6 and F-actin. *Mol Biol Cell* 2007;18(1):76-83.
27. Sadanandam A, Rosenbaugh EG, Singh S, Varney M, Singh RK. Semaphorin 5A promotes angiogenesis by increasing endothelial cell proliferation, migration, and decreasing apoptosis. *Microvascular research* 2010;79(1):1-9.
28. Muharram G, Sahgal P, Korpela T, De Franceschi N, Kaukonen R, Clark K, et al. Tensin-4-Dependent MET Stabilization Is Essential for Survival and Proliferation in Carcinoma Cells. *Dev Cell* 2014;29(4):421-36.
29. Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nature genetics* 1997;16(1):68-73.
30. Joffre C, Barrow R, Menard L, Calleja V, Hart IR, Kermorgant S. A direct role for Met endocytosis in tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 2011;13(7):827-37.

31. Graveel C, Su Y, Koeman J, Wang LM, Tessarollo L, Fiscella M, et al. Activating Met mutations produce unique tumor profiles in mice with selective duplication of the mutant allele. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(49):17198-203.
32. Natali PG, Prat M, Nicotra MR, Bigotti A, Olivero M, Comoglio PM, et al. Overexpression of the met/HGF receptor in renal cell carcinomas. *International journal of cancer* 1996;69(3):212-7.
33. Ivan M, Bond JA, Prat M, Comoglio PM, Wynford-Thomas D. Activated ras and ret oncogenes induce over-expression of c-met (hepatocyte growth factor receptor) in human thyroid epithelial cells. *Oncogene* 1997;14(20):2417-23.
34. Kanteti R, Nallasura V, Loganathan S, Tretiakova M, Kroll T, Krishnaswamy S, et al. PAX5 is expressed in small-cell lung cancer and positively regulates c-Met transcription. *Lab Invest* 2009;89(3):301-14.
35. Ujiie H, Tomida M, Akiyama H, Nakajima Y, Okada D, Yoshino N, et al. Serum hepatocyte growth factor and interleukin-6 are effective prognostic markers for non-small cell lung cancer. *Anticancer research* 2012;32(8):3251-8.
36. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 2012;487(7408):500-4.
37. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316(5827):1039-43.
38. Bardelli A, Corso S, Bertotti A, Hobor S, Valtorta E, Siravegna G, et al. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer discovery* 2013;3(6):658-73.
39. Morotti A, Mila S, Accornero P, Tagliabue E, Ponzetto C. K252a inhibits the oncogenic properties of Met, the HGF receptor. *Oncogene* 2002;21(32):4885-93.
40. Christensen JG, Schreck R, Burrows J, Kuruganti P, Chan E, Le P, et al. 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* 2003;63(21):7345-55.
41. Gridelli C, Peters S, Sgambato A, Casaluca F, Adjei AA, Ciardiello F. ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer treatment reviews* 2013.
42. Lennerz JK, Kwak EL, Ackerman A, Michael M, Fox SB, Bergethon K, et al. MET amplification identifies a small and aggressive subgroup of esophagogastric adenocarcinoma with evidence of responsiveness to crizotinib. *J Clin Oncol* 2011;29(36):4803-10.
43. Merchant M, Ma X, Maun HR, Zheng Z, Peng J, Romero M, et al. Monovalent antibody design and mechanism of action of onartuzumab, a MET antagonist with anti-tumor activity as a therapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(32):E2987-96.
44. Spigel DR, Ervin TJ, Ramlau RA, Daniel DB, Goldschmidt JH, Jr., Blumenschein GR, Jr., et al. Randomized Phase II Trial of Onartuzumab in Combination With Erlotinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2013;31(32):4105-14.
45. Petrelli A, Circosta P, Granziero L, Mazzone M, Pisacane A, Fenoglio S, et al. Ab-induced ectodomain shedding mediates hepatocyte growth factor receptor down-regulation and hampers biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(13):5090-5.

46. Foveau B, Ancot F, Leroy C, Petrelli A, Reiss K, Vingtdoux V, et al. Downregulation of the Met Receptor Tyrosine Kinase by Presenilin-dependent Regulated Intramembrane Proteolysis. *Mol Biol Cell* 2009;20:2494-506.
47. Matsumoto K, Nakamura T, Sakai K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor and Met in tumor biology and therapeutic approach with NK4. *Proteomics* 2008;8(16):3360-70.
48. Coxon A, Rex K, Meyer S, Sun J, Sun J, Chen Q, et al. Soluble c-Met receptors inhibit phosphorylation of c-Met and growth of hepatocyte growth factor: c-Met-dependent tumors in animal models. *Molecular cancer therapeutics* 2009;8(5):1119-25.
49. Martin V, Corso S, Comoglio PM, Giordano S. Increase of MET gene copy number confers resistance to a monovalent MET antibody and establishes drug dependence. *Molecular oncology* 2014.
50. Cepero V, Sierra JR, Corso S, Ghiso E, Casorzo L, Perera T, et al. MET and KRAS gene amplification mediates acquired resistance to MET tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res* 2010;70(19):7580-90.
51. Corso S, Ghiso E, Cepero V, Sierra JR, Migliore C, Bertotti A, et al. Activation of HER family members in gastric carcinoma cells mediates resistance to MET inhibition. *Molecular cancer* 2010;9:121.
52. Qi J, McTigue MA, Rogers A, Lifshits E, Christensen JG, Janne PA, et al. Multiple mutations and bypass mechanisms can contribute to development of acquired resistance to MET inhibitors. *Cancer Res* 2011;71(3):1081-91.
53. Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E, et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell* 2010;17(1):77-88.
54. Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* 2012;487(7408):505-9.
55. Tsuta K, Kozu Y, Mimae T, Yoshida A, Kohno T, Sekine I, et al. c-MET/phospho-MET protein expression and MET gene copy number in non-small cell lung carcinomas. *J Thorac Oncol* 2012;7(2):331-9.
56. network Tegar. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014;511(7511):543-50.
57. Camidge RD, Ou SI, Shapiro G, Otterson GA, Villaruz LC, Villalona-Calero MA, et al. Efficacy and safety of crizotinib in patients with advanced C-MET amplified non-small cell lung cancer (NSCLC). 2014 ASCO Annual Meeting. *J Clin Oncol* 32:5s, 2014. 2014 ASCO Annual Meeting *J Clin Oncol* 32:5s, 2014 Abstract 8001 2014.
58. Hong DS, LoRusso P, Hamid O, Beaupre DM, Janku F, Khan R, et al. First-in-human study of AMG 337, a highly selective oral inhibitor of MET, in adult patients (pts) with advanced solid tumors. 2014 ASCO Annual Meeting *J Clin Oncol* 32:5s, 2014 Abstract 2508 2014.
59. Druker BJ. Perspectives on the development of a molecularly targeted agent. *Cancer Cell* 2002;1(1):31-6.
60. Prochownik EV, Vogt PK. Therapeutic Targeting of Myc. *Genes & cancer* 2010;1(6):650-59.
61. Mai A, Muharram G, Barrow-McGee R, Baghirov H, Rantala J, Kermorgant S, et al. Distinct c-Met activation mechanisms induce cell rounding or invasion through pathways involving integrins, RhoA and HIP1. *J Cell Sci* 2014;127(Pt 9):1938-52.

