

Universités de Lille - Université Lille 2 – Droit et Santé
Institut de Biologie de Lille, CNRS UMR 8161 - Institut Pasteur Lille
Ecole Doctorale Biologie – Santé

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Meriem Sarah MEKKI

En vue de l'obtention du grade de

Docteur d'Université

Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Spécialité : Biologie Cellulaire

<p>CONSEQUENCES DE L'HYPOXIE SUR LA REGULATION DE LA SIGNALISATION HGF/SF-MET</p>
--

Directeurs de thèse : Dr Jérôme VICOONE et Pr Jean-Paul BONTE

Thèse soutenue publiquement le 15/12/2015

Devant un jury composé de :

Président :	Pr Tony LEFEBVRE
Rapporteurs :	Dr Fabienne LAMBALLE
	Dr Gilles PAGES
Examineurs :	Dr Paolo De SEPULVEDA
	Dr David TULASNE
	Pr Jean-Paul BONTE

Remerciements

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci au **Pr Tony Lefebvre** d'avoir accepté de présider ce jury. Merci aux docteurs **Fabienne Lamballe** et **Gille Pagès** d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. Merci au Dr **Paolo de Sepulveda** d'avoir accepté d'être l'examineur de cette thèse.

Je remercie le **Pr Yvan de Launoit** de m'avoir accueillie au sein de l'UMR 8161.

Je remercie très fort le **Dr Oleg Melnyk** de m'avoir accueillie au sein de l'équipe CBC mais également de m'avoir soutenue. Si j'écris ces lignes aujourd'hui, c'est d'abord grâce à vous.

Je remercie sincèrement mes deux directeurs de thèse, le Dr **Jérôme Vicogne** et le **Pr Jean-Paul Bonte**. Merci pour vos conseils, votre disponibilité et votre gentillesse.

Mes profonds remerciements vont au Dr **David Tulasne**. Tous les mots de la langue française ne pourraient suffire pour témoigner de la profonde reconnaissance et gratitude que j'ai envers vous. Alors je vous dirai simplement merci d'avoir été là.

Je remercie évidemment l'équipe CBC, ma « première » équipe ! Un merci tout particulier pour **Fatima**, ma première « amie » dans l'équipe, **Roland**, pour tes conseils et ton écoute, **Manue** et **Hervé** « mes ours dans leur grotte ». Merci d'avoir été présents et de

m'avoir soutenue. Merci à **Charlotte, Eric, Guillaume, Marine, Annick, Raphael** et toute l'équipe. Merci pour votre bonne humeur et votre sympathie.

Je remercie évidemment mon « équipe de cœur », celle qui m'a accueillie les bras ouverts, celle qui m'a aidée, conseillée, formée (et moquée un peu..), l'équipe SIGNAL ! Merci à tous pour tous ces bons moments. Merci pour la science et les fous-rires ! Merci pour tout !

Merci à **Zou** pour tes conseils tant sur le plan scientifique que personnel.

Merci à **Mme Marie-Christine Copin** pour votre aide, vos conseils et votre gentillesse.

Merci à **Aless** pour ton aide, ta gentillesse, tes compétences, tes idées, tes blagues, tes tablettes et j'en passe ! :-P

Merci à **Catherine** pour ta bonne humeur inébranlable et tes blagues 'limites'.. Ok, je sais.. On ne peut pas faire d'ironie ou de sarcasme par écrit. Je reprends : Merci Catherine pour ton intolérance extrême à mes blagues 'limites' :-D merci pour ta rigueur, ta gentillesse et tes compétences. Tu m'as beaucoup appris.

Merci à **Fabrice Lejeune** pour ton écoute, tes conseils et ton humour!

Merci à **Hana** alias « zwewouch ou khaddouj » :-P dork na7ki m3ek bedderja bah 7atta wa7ed ma yefhem. Bessa7 bima anna echef « dialna » imout gla ness dzeyer, sur kechma èjayin yefhmou koulech ! aya sa7a ! :-) w elli fel guelb fel guelb ! :-D

Merci à **Nadège, Samira** (wesh wesh), **Marie, Leslie, Sarah, Jie shuang** et toute l'équipe !

Merci à mon « équipe d'adoption », l'équipe IRCV ! Un grand merci va au Dr **Nadira Delhem**. Merci d'avoir été comme une deuxième maman pour moi.

Enfin, merci à toute l'UMR8161. Un merci particulier va à **Gaëlle, Ingrid, Fatima, Nathalie S, Nathalie M, Nathalie V.** (oui, on a beaucoup de Nathalies..). Votre gentillesse envers moi m'a beaucoup touchée. J'ai adoré vous parler et être à vos côtés même si on n'a pas travaillé ensemble. Merci à toutes les autres personnes de l'unité et de l'institut ainsi qu'à mes collaborateurs qui m'ont aidé ou soutenu d'une manière ou d'une autre.

Bien sûr, un énorme merci va à mes collègues étudiants, en thèse ou en master.

D'abord merci à **Carine** *alias* « la rousse ». Pour absolument tout. Ton amitié m'est précieuse. Je chéris chaque instant et je le grave dans ma mémoire. Tout ce que je peux te dire est : « bon ben.. à plus ! » :-D

Merci à **Morgane et à Chantal.** Votre force est une source d'inspiration (oui, oui, vous avez bien lu !). **Morgane**, merci aussi pour le cake au chocolat que tu vas me faire.. Je sens que je vais me régaler ! :-D

Merci à **Laurissa** *alias* « riri ou poupi », **Rémi, Rami** (i am ze best), **Racha, Mandy, Claire, Marion, Joe, Sonia, Sarah, Céline** et tout l'équipe de **Bioaddoct** et tous ceux que j'oublie peut être..

Enfin, plus que quiconque, merci à ma famille qui a toujours été présente malgré la distance. Et à mes amis qui m'ont toujours soutenu et protégé.

Wa choukrou wal 7amdou lilèh.

Ces trois années ont été riches tant sur le plan scientifique qu'émotionnel. Trois phrases de trois grands scientifiques résument les trois étapes par lesquelles je suis passée au cours de cette thèse.

« The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not 'Eureka!' but 'That's funny...' » Isaac Asimov.

« I have not failed. I have just found 10,000 ways that won't work. » Thomas Alva Edison.

« Most people say that it is the intellect which makes a great scientist. They are wrong: it is character. » Albert Einstein.

Table des matières

Résumé	10
Abstract	11
Table des illustrations	12
Table des abréviations	14
Introduction	18
Chapitre I : Le couple HGF/SF-MET	20
A. Introduction sur le récepteur MET et son ligand le HGF/SF	20
A.1. Découverte du récepteur MET	20
A.2. Découverte de l'HGF/SF	20
A.3. Structure du récepteur MET	21
A.4. Structure de l'HGF/SF	22
A.5. Interactions entre l'HGF/SF et MET	24
A.5.1. Liaison de l'HGF/SF sur MET	24
A.5.2. Activation de MET par l'HGF/SF	26
B. Réseau de signalisation de MET : des partenaires extracellulaires aux voies intracellulaires	26
B.1. Réseau extracellulaire	27
B.1.1. L'héparine et les héparanes sulfates	27
B.1.2. La nucléoline	27
B.2. Réseau membranaire	27
B.2.1. CD44	27
B.2.2. Les intégrines	28
B.2.3. La E-cadhérine	29
B.2.4. La Tensine 4	29
B.2.5. Les plexines et leurs ligands les sémaphorines	29
B.2.6. Les autres RTK	30
B.2.7. Interaction entre le récepteur de mort FAS et le récepteur de survie MET	30
B.3. Réseau intracellulaire	
B.3.1. Activation des voies de signalisation en aval de MET	31
B.3.1.1. Activation du récepteur MET : les molécules mises en jeu	31
B.3.1.2. Principaux partenaires de MET	32
B.3.1.2.a. Notion de protéine adaptatrice	32
B.3.1.2.b. Exemple de GAB1	33
B.3.1.2.c. Autres partenaires : GRB2	33
B.3.1.3. Les voies de signalisations intracellulaires	33
B.3.1.4.a. La voie PI3K/AKT	34
B.3.1.4.b. La voie des MAPK/ERK	34

B.3.1.4.c. Interconnexion des voies de signalisation	35
B.3.2. Internalisation du récepteur MET	36
B.4. Dégradation du récepteur MET	37
B.4.1. Dégradation dépendante du ligand	38
B.4.2. Dégradation indépendante du ligand	41
B.4.2.1. Dégradation de MET par des protéines contenant des régions riches en leucines	41
B.4.2.2. Dégradation de MET par des clivages protéolytiques	41
- clivages régulateurs de la demi-vie de MET	41
- clivages en conditions de stress	42
B.5. Inactivation de MET	46
B.5.1. Rôle de la Sérine 985	46
B.5.2. Les phosphatases	46
B.5.2.1 Rôle des phosphatases	46
a- PTP1B	47
b- T-Cell Phosphatase	47
c- DEP-1 et RPTP- β	48
d- SHP-2	48
B.5.2.2. Régulation des phosphatases	49
C. Les effets cellulaires et tissulaires de la signalisation HGF/SF-MET	50
C.1. Pendant le développement embryonnaire	50
C.2. Implication du couple HGF/SF-MET chez l'adulte	53
C.3. Réponse induite en culture cellulaire	55
D. MET, l'HGF/SF et la matrice extracellulaire	58
D.1. La matrice extracellulaire	58
D.2. L'héparanase	61
D.2.1. Structure de l'héparanase	61
D.2.2. Fonctions de l'héparanase	62
D.2.3. Mécanismes de régulation de l'héparanase	62
D.2.4. L'héparanase dans le cancer	63
E. Implication du couple HGF/SF-MET dans les cancers	63
E.1. Les mutations du récepteur MET	63
mutations du domaine extracellulaire	64
mutations du domaine juxtamembranaire	65
mutations retrouvées au niveau du domaine kinase	66
E.2. La surexpression du récepteur	68
E.3. L'hypersecrétion du ligand	70
E.4. Notion d'addiction à MET	73
E.5. Interactions de MET avec d'autres RTK	73
E.6. Implication de MET dans la métastase cancéreuse	75
F. MET et les thérapies ciblées	75
F.1. Molécules compétitrices de l'interaction HGF/SF-MET (molécules antagonistes de l'HGF/SF et de MET)	76
F.2. Anticorps monoclonaux ciblant l'HGF/SF ou MET	

(anticorps bloquants)	77
F.3. inhibiteurs du domaine tyrosine-kinase de MET	78
F.4. Notion de sensibilités aux thérapies ciblées	82
G. MET et le système immunitaire	83
H. MET et les résistances aux thérapies ciblées	84
H.1. Implication de MET dans les résistances aux thérapies ciblant d'autres RTK	84
H.2. Résistances aux thérapies ciblant MET	86
Chapitre II : L'Hypoxie	90
A. Quelques notions générales sur le concept d'hypoxie	90
B. Détection et adaptations cellulaires à l'hypoxie	90
B.1. Les Hypoxia Inducible Factors (HIFs)	91
B.2. Mais comment les cellules arrivent-elles à détecter les fluctuations du niveau d'oxygène via HIF?	92
B.3. Régulation de la protéine HIFa	92
B.4. Adaptations cellulaires à l'hypoxie	95
C. L'hypoxie tumorale	97
C.1. Le microenvironnement tumoral	97
C.1.1. Généralités	97
C.1.2. Définition	97
C.1.3. Les cellules immunitaires	97
C.2. L'hypoxie et le cancer	98
C.2.1. Généralités	98
C.2.2. Présence de zones hypoxiques au sein des tumeurs	98
C.2.3. Rôle des HIFs dans le cancer	99
C.2.4. Autres mécanismes menant à l'augmentation transcriptionnelle de HIF	101
C.3. L'acidité du milieu extracellulaire	101
C.4. L'hypoxie et la métastase cancéreuse	103
C.4.1. Première étape : la transition épithélio-mésenchymateuse	104
C.4.2. Seconde étape : l'invasion	104
C.4.3. Troisième étape : l'intravasation	104
C.4.4. Dernière étape : l'extravasation	105
D. L'hypoxie et les enjeux thérapeutiques	105
D.1. L'hypoxie et la chimiorésistance	106
D.2. L'hypoxie et la radiorésistance	106
D.3. Ciblage de HIF1 et de ses gènes cibles	107
E. L'hypoxie et les RTK	108
E.1. Les ligands des RTK	108
E.1.1. La famille du VEGF	108

E.1.2. Le PDGF et l'IGF	108
E.1.3. Le TGF	109
E.2. Les RTK	109
E.2.1. La famille de l'EGFR	109
E.2.2. Les autres RTK	110
E.2.2.a. L'IGFR	110
E.2.2.b. Le FGFR3	110
E.2.2.c. RON et AXL	110
F. L'hypoxie et la signalisation HGF/SF-MET	111
MET, HIF1a et leurs régulations croisées	113
Objectifs de la thèse	114
Résultats	115
Partie I :	115
I.1. Matériels et Méthodes	116
I.2. Résultats	119
Partie II : Influence de l'hypoxie sur la signalisation HGF/SF-MET	127
II.1. Résumé et contexte de la publication	
II.2. Article	
II.3. Expériences complémentaires	129
Discussion	145
Références bibliographiques	168
Annexe	213

Résumé

L'*Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor* (HGF/SF) est un facteur de croissance multifonctionnel dont l'interaction avec le récepteur tyrosine kinase MET est essentielle pour assurer le contrôle de la survie, de la migration et de la morphogenèse des cellules épithéliales. Ce couple ligand-récepteur est également impliqué dans des processus cellulaires favorisant l'invasion et la métastase dans le cancer. Dans ce contexte, plus de 240 essais cliniques sont en cours pour évaluer l'efficacité d'inhibiteurs ciblant MET.

Il est également clairement établi que le microenvironnement tumoral, et particulièrement l'hypoxie, joue un rôle important dans l'invasion et la métastase tumorales ainsi que dans la résistance aux traitements. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés aux conséquences de l'hypoxie sur la régulation de la signalisation induite par l'HGF/SF.

Au cours de ce travail, nous avons montré qu'en condition hypoxique la phosphorylation du récepteur MET en réponse à l'HGF/SF subit une baisse drastique. Cette baisse est induite en quelques minutes et est rapidement réversible. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans des xénogreffes de tumeurs établies chez des souris SCID où la phosphorylation de MET diminue dans certaines zones hypoxiques. Cette diminution n'a cependant aucune conséquence sur les voies en aval comme la voie MAPK/ERK et PI3K/AKT ni sur les réponses biologiques induites par l'HGF/SF comme la survie, la migration, la dispersion et la morphogenèse.

Par ailleurs, nous avons montré que la phosphorylation de MET peut être restaurée par une inhibition des phosphatases. Il est donc envisageable que durant l'hypoxie l'activité de certaines phosphatases soit augmentée conduisant à la déphosphorylation du récepteur.

En outre, la plupart des thérapies ciblées en développement contre MET sont des inhibiteurs de son activité tyrosine kinase (TKI). Puisque la phosphorylation de MET est directement impactée en hypoxie, nous avons émis l'hypothèse que l'efficacité de ces inhibiteurs puisse être modifiée dans ces conditions. Nos résultats démontrent que les TKI ciblant MET sont moins efficaces en hypoxie. Cette efficacité, tout comme la phosphorylation de MET, est restaurée après réoxygénation des cellules.

Abstract

The Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF) is a multifunctional growth factor whose interaction with the tyrosine kinase receptor MET is essential for growth, migration and survival of epithelial cells. This pair of ligand-receptor is also involved in cancer invasion and metastasis. Furthermore, a causative link has been established between MET and tumor progression. In this context, more than 240 clinical trials are being undergone to evaluate MET inhibitors efficiency.

It is also widely established that tumoral microenvironment, and particularly hypoxia, plays an important role in tumoral invasion, metastasis and in treatment resistance. It is in this context that we studied the consequences of hypoxia on HGF/SF-MET signaling.

Our results show dynamic, reversible and extreme decrease in MET phosphorylation under hypoxic conditions. These results have also been confirmed *in vivo* with SCID mice models. This decrease was without any consequence neither on downstream signaling pathways nor on biological responses upon HGF/SF stimulation.

A preliminary result using a general phosphatase inhibitor was able to restore MET phosphorylation suggesting a higher phosphatase activity under hypoxia.

Our results also show that MET-targeted-TKI efficiency under hypoxic conditions is decreased. However, this efficiency, as MET phosphorylation, is restored upon cell reoxygenation.

Table des illustrations

Figures:

- Figure 1 :** Famille des récepteurs tyrosine kinase
- Figure 2 :** Le récepteur Tyrosine Kinase MET
- Figure 3 :** L'*Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor* (HGF/SF)
- Figure 4 :** Modélisation de l'interaction entre l'HGF/SF et MET
- Figure 5 :** Les partenaires membranaires de MET
- Figure 6 :** Partenaires recrutés et réponses biologiques induites par MET
- Figure 7 :** Internalisation, recyclage et dégradation du récepteur MET
- Figure 8 :** *Partie I.* Figure schématisant la dégradation de MET de manière indépendante du ligand : dégradation par des protéines contenant des régions riches en leucine
Partie II. Figure schématisant la dégradation de MET de manière indépendante du ligand : dégradation par clivages protéolytiques en conditions physiologiques et en conditions de stress apoptotique et nécrotique
- Figure 9 :** Crosstalk entre la signalisation des RTK et l'oxydation des PTP par les ROS
- Figure 10 :** A – Embryons de souris sauvages et *hgf/sf*^{-/-} à J13,5
B – Foies d'embryons de souris sauvages et *hgf/sf*^{-/-} à J14,5
C – Schéma de la migration des myoblastes vers les bourgeons des membres
- Figure 11 :** A – Les souris MET KO ont une régénération du foie plus lente
B – Structure du domaine K1 de l'HGF/SF
- Figure 12 :** Principales réponses biologiques du couple HG/SF-MET sur des cellules épithéliales (MDCK) en culture
- Figure 13 :** Aperçu général de l'organisation de la matrice extracellulaire
- Figure 14 :** Structure des glycosaminoglycanes de type héparane sulfate
- Figure 15 :** Mutations de MET identifiées et répertoriées chez l'Homme
- Figure 16 :** Principales mutations et mécanismes de régulation du domaine juxtamembranaire de MET codé par l'exon 14
- Figure 17 :** Expression du récepteur MET dans les cancers pulmonaires
- Figure 18 :** Principales stratégies d'inhibition du récepteur MET
- Figure 19 :** Résumé schématique de certains mécanismes moléculaires menant aux résistances acquises aux TKIs
- Figure 20 :** A – régulation des sous-unités de HIF1 en conditions physiologiques
B – régulation des sous-unités de HIF1 en présence et en absence d'éléments inhibant l'action des prolyl hydroxylases (PHD)
- Figure 21 :** Adaptations cellulaires induites par l'hypoxie tumorale
- Figure 22 :** Le gradient de pH régule la migration de la cellule cancéreuse
- Figure 23 :** Activation des RTK de manière dépendante de l'hypoxie
- Figure 24 :** A – Expressions géniques de la CAIX et de la HPSE dans les HT1080 après 4, 8 et 24 heures d'hypoxie
B – Expressions géniques de la CAIX et de la HPSE dans les HT1080 après 4, 8 et 24 heures d'hypoxie

- Figure 25 :** Expression de la HPSE et de la CAIX dans les HT1080 et HT1080 HPSE+ en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées (4h, 8h et 24h)
- Figure 26 :** Morphologie des cellules en culture de Matrigel™ (18h)
- Figure 27 :** Mesure de l'acidification du milieu extracellulaire par les HT1080 et les HT1080 HPSE+ au cours du temps
- Figure 28 :** Signalisation HGF/SF-MET en présence ou pas d'HGF/SF dans les HT1080 HPSE+ en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées
- Figure 29 :** Effets d'une stimulation des HT1080 par du K1/S ou du surnageant de MRC5 en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées
- Figure 30 :** Quantification de la phosphorylation du récepteur MET en conditions normoxiques et hypoxiques contrôlées
- Figure 31 :** Effet d'un « choc hypoxique » sur la signalisation HGF/SF-MET
- Figure 32 :** Effets d'un traitement par du PHA-665752 et du SU11274 en présence ou non d'HGF/SF en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées
- Figure 33 :** Effets d'un traitement par un inhibiteur de PKC à doses croissantes en présence ou pas d'HGF/SF en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées
- Figure 34 :** Signalisation HGF/SF-MET en présence ou pas d'HGF/SF dans les HS746T en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées
- Figure 35 :** Effets d'un traitement par un inhibiteur de PTP1B à doses croissantes en présence ou pas d'HGF/SF en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées
- Figure 36 :** Effets d'un traitement par du crizotinib à doses croissantes en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées en présence ou non d'HGF/SF
- Figure 37 :** Signalisation EGF/EGFR en présence ou pas d'HGF/SF ou d'EGF dans les MCF10A en conditions de normoxie, d'hypoxie et de réoxygénation contrôlées
- Figure 38 :** Effets d'un traitement par du géfitinib à doses croissantes en conditions de normoxie, d'hypoxie et de réoxygénation contrôlées en présence ou non d'EGF
- Figure 39 :** Structures chimiques du PHA-665752, du SU11274 et du crizotinib (PF 02341066).

Tableaux :

Tableau 1 : Tableau des cancers impliquant le couple HGF/SF-MET

Tableau 2 : MET et les thérapies ciblées dont le développement est actuellement en cours.

Table des abréviations

AcSé : Accès sécurisé à des thérapies ciblées innovantes

ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ALK : Anaplastic Lymphoma Kinase

ALPHA Screen : Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay Screen

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ARNT : Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator

ATP : Adénosine TriPhosphate

BAD : Bcl2-Associated Death Promoter

bHLH-PAS : basic-helix-loop-helix-PAS (Per Arnt Sim)

BIM I : BisIndolylMaleimide I

c-CBL : c-Casitas B-cell Lineage

CA : Anhydrases Carboniques

CAF : Cancer Associated Fibroblasts

CAIX/CAXII : Anhydrases Carboniques de type 9/12

CBC : Chimie et Biologie du Cancer

CBP : CREB Binding Protein

CCRC : Clear cell renal carcinoma

CD44 : Cluster of Differentiation 44

Cdc6 : Cell division cycle 6

CDK : Cycline-Dependant Kinase

CIN-85 : Cbl-Interacting Protein of 85 kDa

CoCl₂ : Chlorure de Cobalt

COSMIC : Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer

CRK : CT10 (chicken tumor virus number 10) Regulator of Kinase

CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4

DEP-1 : Density-enhanced phosphatase-1

DISC : Death Inducing Signaling Complexe

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

E-cadhérine : Epithelial-cadhérine

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition

EMV : endosome multivésiculaire

EPO : Erythropoietin

ERK : Extracellular Signal -Regulated Kinase

ERM : Ezrines, Radixines et Moesines

ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport

ETS1 : Avian Erythroblastosis Virus E26 homolog-1

FAC : fibroblastes associés aux cancers

FAK : Focal Adhesion Kinase

FAS : Fibroblast ASsociated

FGF : Fibroblast Growth Factor

FGFR3 : Fibroblast Growth Factor Receptor 3

FIH-1 : Factor Inhibiting HIF-1

FISH : Hybridation in situ en fluorescence

GAB1 : GRB2-Associated Binder1

GAG : glycosaminoglycanes

GBM : Glioblastoma multiforme

GFR α 1 : GDNF family receptor alpha-1

GGA3 : Golgi-localized γ -ear-containing Arf-binding protein 3

GLUT 1/3 : Glucose transporter 1/3

GDNF : Glial cell-Derived Neurotrophic Factor

GRB2 : Growth factor receptor-bound protein 2

GST : Glutathione S Transferase

HA : Hyaluronic Acid

HAI 1/2 : Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor 1/2

HCAEC : Human Coronary Arterial Endothelial Cells

HDMEC : Human Dermal Microvascular Endothelial Cells

HER2/3 (ErbB2/3) : human epidermal growth factor receptor 2/3

HGF/SF : Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor

HGFA : Hepatocyte Growth Factor Activator

HIF1/2/3 α : Hypoxia Inducible Factors 1/2/3 alpha

HIF1 β : Hypoxia Inducible Factors 1 beta

HL : Hairpin Loop

HO-1 : Heme-Oxygenase-1

HRE : Hypoxia Responsive Elements

HRS : HGF Regulated tyrosine kinase Substrate

HS : Heparan Sulfate

Hsp90 : Heat shock protein 90

HSPG : Heparan Sulfate ProteoGlycan

HUVEC : Human umbilical vein endothelial cells

IFP : Interstitial Fluid Pressure

IGF1/2 : Insulin-like Growth Factor 1/2

IGFR : Insulin-like Growth Factor Receptor

IHC : ImmunoHistoChemistry

IKK : I κ B Kinase

IL-1 β : InterLeukine-1 β

Inlb : Internaline B

IPAS : Inhibitory PAS domain protein

IPT : Immunoglobulin-like region in Plexin and Transcription factors

K1-K4 : Kringle 1-4

K1B/S : Kringle 1 de l'HGF/SF biotinylé et couplée à de la streptavidine

KI : Knock In

KO : Knock Out

KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog

LBA : Ligand Binding Assays

LRIG1 : Leucine-rich Repeats and ImmunoGlobulin-like Domains 1

MAb : Monoclonal Antibody

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MBD : MET Binding Domain

MBP : Myelin Basic Protein

MCM : Mini Chromosome Maintenance

MCT : Monocarboxylate Transporteur

MDR1 : multidrug resistance

MEC : Matrice ExtraCellulaire

MEK1 : MAP/ERK Kinase 1

MET ou HGFR : Hepatocyte Growth Factor Receptor

MET-CTF : C-Terminal Fragment

MET-ICD : IntraCellulaire Domain

MET-NTF : N-Terminal Fragment

mi-RNA : micro-RiboNucleic Acid

MMP2 : Matrix MetalloProteinase 2

MRS : MET Related Sequence

MSP : Macrophage Stimulating Protein

MT1-MMP : Membrane Type 1-Matrix MetalloProteinase 1

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

NGF : Nerve Growth Factor

NGS : New Generation Sequencing

NHE-1 : Sodium/Hydrogen Exchanger

NK1/NK2/NK4 : variant de l'HGF/SF composé du domaine N et du domaine Kringle 1/2 ou 4.

nPTP : non-transmembrane Protéines Tyrosines Phosphatases

NSCLC : Non-Small Cell Lung Cancer

NSF : N-ethylmaleimide-sensitive factor

ODD : Oxygen-Dependant Degration domain

PCR : polymerase chain reaction

PD : Progressive Disease

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PDPK1 : 3-Phospho Inositide Dependent Protin Kinase-1

PGE2 : Prostaglandine E2

PH : Pleckstrin Homology domain

PHD : Prolyl Hydroxylase Domain proteins

pHe : pH extracellulaire

pHi : pH intracellulaire

PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase

PIP₂ : Phosphatidyl Inositol (4, 5) biPhosphate

PIP₃ : Phosphatidyl Inositol (3, 4, 5) triPhosphate

PKC : Proteine Kinase C

PLC γ : PhosphoLipase C γ

PP2A : Protein Phosphatase 2

PR : Partial Response

pro-HGF/SF : pro-Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor

PSI : Plexin Semaphorin Integrin

PTEN : Phosphatase and TENSin homolog

PTP : Protein Tyrosine Phosphatase

PTP1B : Protein Tyrosine Phosphatase 1B

PTPN11 : Tyrosine-Protein Phosphatase
Non-receptor type 11

Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin
substrate 1

RAS : Rat Sarcoma

RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

RECIST : Response Evaluation Criteria
in Solid Tumors

RNA : RiboNucleic Acid

RON : Récepteur d'Origine Nantais

ROS : Reactive Oxygen Species

RPLP0 : 60S acidic ribosomal protein P0

rPTP : receptor-like Protéines Tyrosines
Phosphatases

RT-PCR : Reverse transcription
polymerase chain reaction

RTK : Récepteur à activité Tyrosine
Kinase

SD : Stabilization Disease

SDR : SensorDish Reader

SH2 : Src Homology 2

SHC : SH2 domain containing
transforming protein

SHP-2 : Src Homology region 2 domain-
containing phosphatase-2

SIGNAL : Signalisation, apoptose et
cancer

siRNA : small interfering RNA

SOS : Son of Sevenless

SPH : Serine Proteinase Homology

SPK-1 : Sphingosine Kinase-1

STAT 3 : Signal Transducer and
Activator of Transcription 3

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TGF α : Transforming Growth Factor- α

TKI : Tyrosine Kinase Inhibitors

TNF : Tumor Necrosis Factor

tPA : tissue-type plasminogen activator

TPR : Translocated Promoter Region

uPA : urokinase plasminogen activator

uPAR : Urokinase receptor

VEGF : Vascular Endothelial Growth
Factor

VEGFR/2 : Vascular Endothelial Growth
Factor Receptor/2

VHL : Von Hippel-Lindau

VIL : vésicules intra-luminales

ZS : Zell Shield.

Introduction

Depuis la découverte des premiers récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) il y a plus d'une trentaine d'années, 58 RTK humains, subdivisés en vingt (20) familles, ont été identifiés. Parmi ces récepteurs se trouvent par exemple les récepteurs aux facteurs de croissance de l'épiderme (*Epidermal Growth Factor Receptor* EGFR), les récepteurs aux facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* VEGFR) et le récepteur au facteur de croissance des hépatocytes (*Hepatocyte Growth Factor* HGFR ou MET) (figure 1). Tous les RTK ont une même architecture globale avec une région extracellulaire liant le ligand, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique contenant un domaine à activité tyrosine kinase associé à un domaine juxtamembranaire et un domaine C-terminal régulateur. Ces récepteurs-enzymes sont des régulateurs clés de réponses cellulaires critiques comme la prolifération, la survie et la migration cellulaire (Blume-Jensen and Hunter 2001, Skead and Govender 2015, Ullrich and Schlessinger 1990). Des mutations et des activations aberrantes des RTK sont liées de manière causale avec des maladies diverses comme le diabète, l'inflammation, l'artériosclérose et le cancer. Par ailleurs, leur dérégulation est souvent associée à un mauvais pronostic dans le cadre du cancer, faisant de ces RTK des cibles intéressantes dans le développement de molécules thérapeutiques actuellement évaluées dans de nombreux essais cliniques (Lemmon and Schlessinger 2010, McDonnell et al 2015).

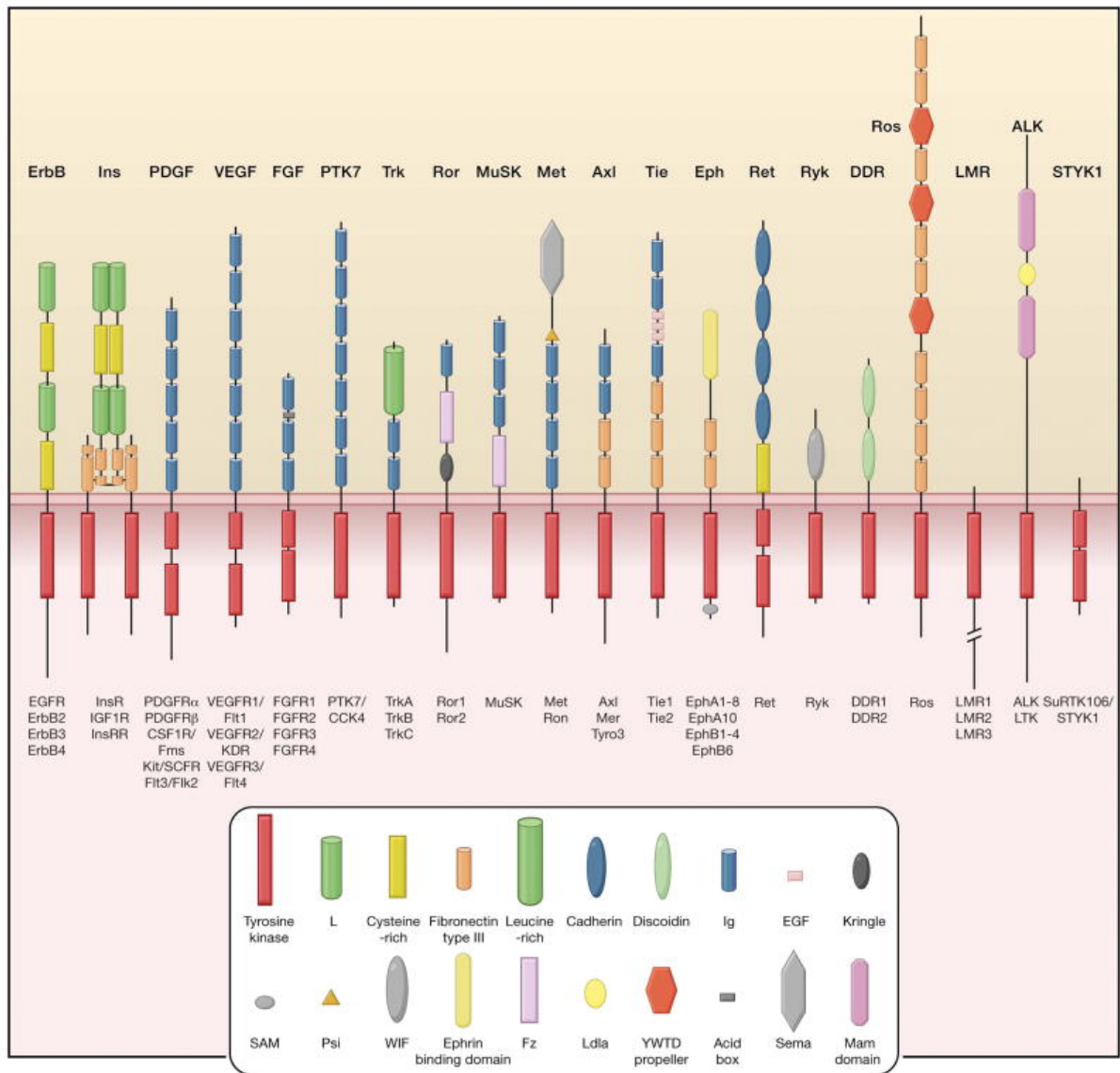


Figure 1 - Famille des récepteurs tyrosine kinase (Lemmon and Schlessinger 2010)

Représentation schématique de 20 sous-familles de RTK humains avec les membres de chaque groupe listés sous chaque récepteur. Les différents domaines sont représentés. Des domaines extracellulaires variables sont représentés schématiquement avec une clé correspondant (par exemple un domaine riche en leucine ou en cystéine ou un domaine kringle) ainsi que la partie intracellulaire conservée contenant le domaine kinase.

Chapitre I : Le couple HGF/SF-MET.

A. Introduction sur le récepteur MET et son ligand le HGF/SF :

A.1. Découverte du récepteur MET :

Le récepteur MET a été découvert, en 1984, sous la forme d'un oncogène (TPR-MET) isolé de lignées cellulaires issues d'un ostéosarcome humain exposées à un carcinogène chimique (Cooper et al 1984). Cet oncogène est le fruit d'un réarrangement chromosomique, où un fragment du gène *tpr* (*translocated promoter region*) sur le chromosome 1, codant un motif de dimérisation protéine-protéine, fusionne avec un fragment du gène *met* sur le chromosome 7 (7q21-31) (Park et al 1986, Peschard and Park 2007), codant la portion intracellulaire du récepteur à activité tyrosine kinase MET. Cette association permet d'expliquer le caractère transformant de la protéine chimérique résultante, où la partie TPR entraîne une dimérisation permanente menant à l'activation du domaine kinase de MET (Rodrigues and Park 1993). Par ailleurs, le récepteur à l'origine de l'activité tyrosine kinase a été nommé ainsi en référence au carcinogène chimique utilisé (N-methyl-N'-nitroso-guanidine) (Park et al 1987).

A.2. Découverte de l'HGF/SF :

Peu de temps après la découverte de MET, l'*Hepatocyte Growth Factor* (HGF) a été identifié comme un facteur mitogène des hépatocytes. Il a été isolé à partir du sérum de rats ayant subi une hépatectomie partielle (Nakamura et al 1984). Quelques années plus tard, le *Scatter Factor* (SF) a été isolé et purifié à partir de fibroblastes. Ce facteur est capable d'induire la dispersion des cellules épithéliales (Stoker et al 1987). Il aura fallu attendre 1991 pour que non seulement il soit démontré que l'HGF et le SF sont la même protéine codée par une seule et même séquence d'ADN (Weidner et al 1991) mais qu'également, cette molécule, maintenant renommée HGF/SF, est le ligand spécifique et de haute affinité du récepteur MET (Bottaro et al 1991, Naldini et al 1991b, Naldini et al 1991c, Weidner et al 1991).

A.3. Structure du récepteur MET :

Le gène *met*, qui compte 120 kb répartis sur 21 exons et 20 introns, code un ARNm de 8 kb (Lin et al 1998). Cet ARNm est traduit en une protéine glycosylée de 170 kDa qui correspond au MET immature. Ce dernier est clivé par la furine sur un site consensus localisé entre les résidus 307 (lysine) et 308 (arginine) générant le MET mature (Komada et al 1993). Contenant deux chaînes, α et β , de 50 et 145 kDa respectivement, reliées par des ponts sulfures (Tempest et al 1988), le MET mature est composé d'une portion extracellulaire (constituée de la chaîne α et la région N-terminale de la chaîne β qui interagit avec la chaîne α), d'une hélice transmembranaire qui permet au récepteur de s'ancrer à la membrane cellulaire et une portion intracellulaire. Ces deux dernières portions constituent le reste de la chaîne β . La partie intracellulaire contient les domaines kinase et juxtamembranaire ainsi que la partie C-terminale essentielle pour la signalisation en aval (Birchmeier et al 2003).

La chaîne α ainsi que les 212 premiers résidus de la chaîne β constituent le domaine SEMA (nommé ainsi car homologue à certains domaines structuraux retrouvés dans les sémaphorines) (Gherardi et al 2003). Ce dernier est suivi par un domaine de 50 résidus riche en cystéines appelé le domaine PSI (pour *Plexin Semaphorin Integrin* ou encore MRS pour *MET Related Sequence*) qui est immédiatement suivi de quatre domaines homologues aux immunoglobulines G numérotés de 1 à 4 et appelés domaines IPT (*Immunoglobulin-like region in Plexin and Transcription factors*) (figure 2) (Benvenuti and Comoglio 2007). Contrairement au domaine SEMA qui est globulaire, les domaines PSI et IPT sont longilignes (Gherardi et al 2003). Ces derniers sont reliés à l'hélice transmembranaire qui est elle-même liée à la partie intracellulaire *via* la partie juxtamembranaire. Le reste du domaine cytoplasmique est constitué d'un domaine kinase et d'une partie C-terminale régulatrice. La partie cytoplasmique est donc celle responsable de la régulation de l'activité du récepteur MET. En effet, le domaine kinase porte l'activité catalytique ; la partie C-terminale contient le site de recrutement multi-substrats tandis que le domaine juxtamembranaire régule de manière négative le récepteur (Schiering et al 2003, Wang et al 2006) (figure 2).

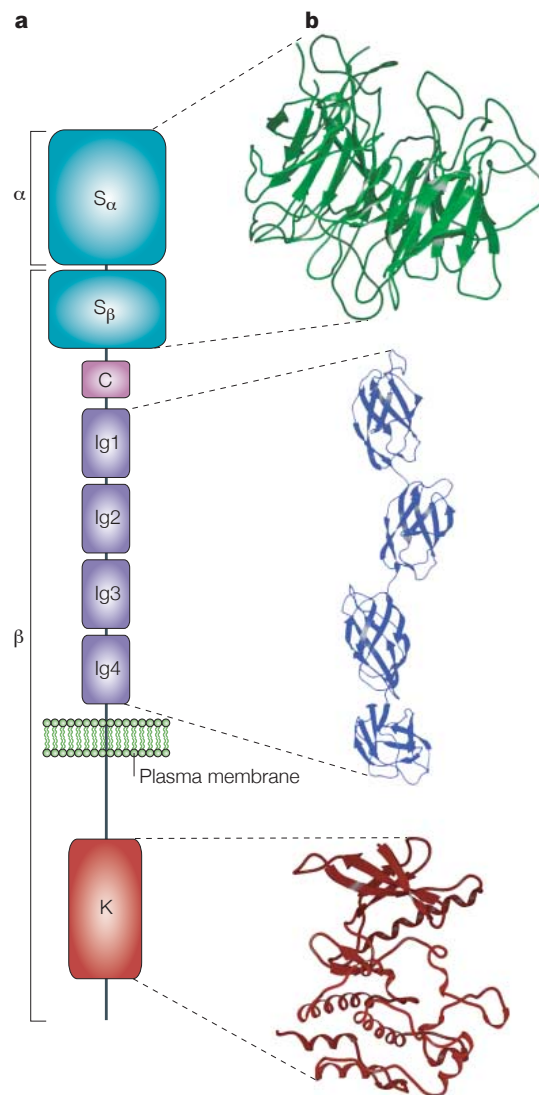


Figure 2 – Le récepteur Tyrosine Kinase MET (Birchmeier et al 2003).

a- Les domaines de MET (ainsi que les sous unités α et β). S : SEMA domain, C : domaine riche en cystéines ou PSI. Ig : immunoglobulines (IPT). K : domaine à activité tyrosine kinase.

b- Représentation en 3D issue de la structure cristallographique des domaines SEMA, IPT et kinase de MET.

A.4. Structure de l'HGF/SF :

Le gène *hgf/sf* code une large protéine homologue au plasminogène et contenant de multiples domaines fonctionnels. Il est situé au niveau du chromosome 7 (7q21.1) et est constitué de 18 exons et de 17 introns (Seki et al 1991). Ce sont principalement les cellules mésenchymateuses (incluant les fibroblastes, macrophages et cellules endothéliales) qui secrètent l'HGF/SF sous la forme d'un précurseur inactif, le pro-HGF/SF. Celui-ci s'accumule dans la matrice extracellulaire du fait de sa grande avidité

pour les glycosaminoglycanes (Pennacchietti et al 2014). A noter que durant la réparation tissulaire par exemple, plusieurs cytokines dans le compartiment interstitiel induisent une augmentation de l'expression du pro-HGF/SF par les fibroblastes et les macrophages résiduels (Bhowmick et al 2004, Michalopoulos and DeFrances 1997).

Par la suite, le pro-HGF/SF est converti en un hétérodimère actif par clivage dans un site *trypsin-like* localisé entre l'arginine 494 et la valine 495 (Gak et al 1992, Naldini et al 1992). Ce clivage est effectué par des enzymes spécifiques de type sérines protéases, abondantes dans le microenvironnement. Parmi ces protéases se trouvent l'HGFA (*HGF Activator*) (Miyazawa et al 1993), la Matriptase et l'Hépsine (Gherardi et al 2006, Naldini et al 1992, Owen et al 2010, Qiu et al 2007). Ces deux dernières sont exprimées à la surface des cellules, alors que l'HGFA est quant à elle une protéase soluble activée par la thrombine (Shimomura et al 1993). Il a également été démontré que d'autres protéases peuvent être impliquées dans ce processus de maturation comme les activateurs du plasminogène uPA et tPA (respectivement *urokinase* et *tissue-type plasminogen activators*). Par ailleurs, le clivage effectué par l'HGFA est régulé de manière négative par HAI1 (*HGF Activator Inhibitor 1*) et HAI2 (Morris et al 2005, Shimomura et al 1997).

Le produit de clivage du pro-HGF/SF donne donc lieu à une protéine hétérodimérique d'environ 100 kDa de poids moléculaire apparent, appelée HGF/SF et constituée d'une chaîne α de 69 kDa et d'une chaîne β de 34 kDa reliées par un pont disulfure (Holmes et al 2007, Nakamura et al 1987, Nakamura 1991). Ce facteur de croissance est composé de 6 domaines : un domaine N-terminal (domaine N – également appelé domaine HL pour *Hairpin Loop*), quatre domaines Kringle (K1-K4) constituant la chaîne α et un domaine homologue des sérines protéases (*serine proteinase homology domain* – SPH), constituant la chaîne β mais dépourvu d'activité enzymatique par la présence de mutations sur des résidus catalytiques essentiels (Lokker et al 1992, Seki et al 1991, Stella and Comoglio 1999) (figure 3).

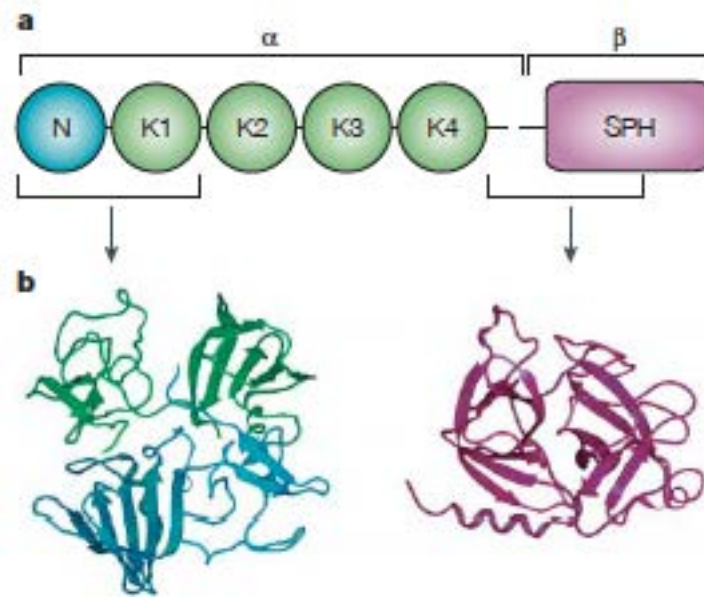


Figure 3 – L'*Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor* (HGF/SF) (Birchmeier et al 2003).

a- Représentation schématique des domaines de l'HGF/SF : le domaine N-terminal ; les Kringle domains K1-K4 (le tout constituant la sous unité α) et le serine protease homology (SPH) domain (constituant la sous unité β).

b- Structures cristallisées du domaine NK1 (fragment contenant le domaine N-terminal et le domaine Kringle 1) et du domaine SPH.

A.5. Interactions entre l'HGF/SF et MET :

A.5.1. Liaison de l'HGF/SF sur MET :

Le pro-HGF/SF est capable de se lier au récepteur mais ne peut l'activer (Lokker et al 1992) contrairement à l'HGF/SF mature (Bottaro et al 1991, Naldini et al 1991b, Naldini et al 1991c).

Il existe deux sites de liaisons sur l'HGF/SF pour son récepteur : le site de basse affinité qui est localisé au niveau de la chaîne β (Stamos et al 2004) et le site de haute affinité, localisé au niveau des domaines N et K1 de la chaîne α (Lokker et al 1992, Lokker et al 1994). La co-cristallographie de l'interaction entre la chaîne β et MET a permis de montrer que cette interaction a lieu avec le domaine SEMA du récepteur (Stamos et al 2004). En revanche, du fait de l'absence de structure cristallographique de la chaîne α en interaction avec le récepteur, son site de fixation sur MET n'est pas encore clairement identifié. Certaines études le situent au niveau des domaines IPT3 et 4

(Basilico et al 2008) alors que d'autres le situent au niveau du domaine SEMA (Gherardi et al 2006, Kong-Beltran et al 2004).

Par ailleurs, l'HGF/SF possède un variant naturel (NK1), composé de la région N-terminale et du domaine K1. Des études structurales ont démontré que la forme biologiquement active du variant NK1 consistait en sa forme dimérisée. Cette dimérisation naturelle implique une interaction tête-bêche des domaines N et K1 et engage deux molécules de MET suggérant que le domaine NK1 dimérisé constitue l'unité minimale capable de lier et d'activer MET (figure 4) (Chirgadze et al 1999, Gherardi et al 2006). Néanmoins, il a récemment été montré dans mon équipe (Chimie et Biologie du Cancer -CBC) que K1 constitue le domaine minimal nécessaire et suffisant pour l'activation efficace de MET. En effet, la synthèse chimique du sous-domaine K1 biotinylé et présenté en dimère par association biotine/streptavidine a montré que ce complexe était capable d'induire la phosphorylation de MET ainsi que la dispersion, la morphogénèse et la survie des cellules. De plus, ces constructions de K1 dimérisé ont été injectées dans des souris présentant une hépatite fulminante induite. Ces constructions ont permis une protection du foie supérieure à celle de l'HGF/SF et du variant NK1 (Simonneau et al 2015).

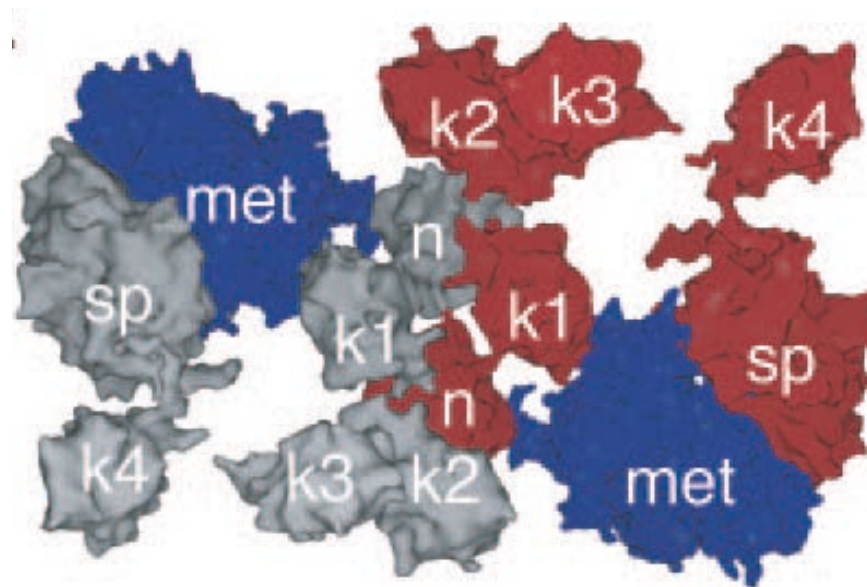


Figure 4 – Modélisation de l'interaction entre l'HGF/SF et MET.

MET est représenté en bleu et les deux molécules d'HGF/SF sont en rouge et gris. Dans cette représentation, les deux molécules d'HGF/SF sont liées par les domaines N et K1 en tête-bêche et chacune d'entre elle est associée à un domaine SEMA de MET, conduisant à la dimérisation du récepteur.

Sp : domaine d'homologie à la sérine protéase (SPH), k1 à k4 : domaines kringle 1 à 4, n : domaine N-terminal de l'HGF/SF (Gherardi et al 2006)

En plus de lier MET, l'HGF/SF lie également l'héparine (Sakata et al 1997), les dermatanes sulfates (Lyon et al 1998) ou les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) (Lyon et al 1994) *via* son domaine N (Rubin et al 2001). Cette liaison limite la diffusion de l'HGF/SF *in vivo* mais n'est pas nécessaire pour l'activation du récepteur MET (Hartmann et al 1998). Il a néanmoins été démontré que la présence de ces co-récepteurs facilitait la pleine dimérisation et activation du récepteur (Kemp et al 2006).

A.5.2. Activation de MET par l'HGF/SF :

L'activation de MET implique donc son homodimérisation et stabilisation suite à sa liaison avec l'HGF/SF. Cette dimérisation induit sa *trans*-auto-phosphorylation sur des résidus tyrosines de la boucle d'activation du domaine kinase (Y1234 et Y1235) puis sur des tyrosines de la partie C-terminale (Y1349 et Y1356). Ces activations permettent d'initier les voies de signalisation en aval de MET qui sont à l'origine de l'action biologique du couple HGF/SF-MET (Ferracini et al 1995, Longati et al 1994, Naldini et al 1991a).

B. Réseau de signalisation de MET : des partenaires extracellulaires aux voies intracellulaires :

La diversité des réponses induites par MET est liée aux différentes interactions qu'entretient le récepteur avec ses partenaires. Qu'ils se lient de manière directe ou indirecte au récepteur ou qu'ils aient ou pas une activité kinase, la liaison et interaction des différents partenaires avec le récepteur est primordiale pour non seulement l'amplification mais également la spécificité et l'efficacité du signal transmis. En effet, MET interagit avec des partenaires extracellulaires comme les héparanes sulfates, qui potentialise sa liaison avec l'HGF/SF. Il agit également avec des partenaires membranaires et intracellulaires dont les actions interconnectées modulent la signalisation du récepteur (figure 6).

B.1. Réseau extracellulaire :

B.1.1. L'héparine et les héparanes sulfates :

Comme précisé précédemment, l'HGF/SF est capable de se lier avec l'héparine et les héparanes sulfates *via* son domaine N. En effet, le domaine NK1 a été co-cristallisé en présence d'héparine avec l'existence d'une interaction avec le domaine N. Ce domaine, riche en acides aminés basiques, se lie avec l'héparine par l'intermédiaire de liaisons hydrogène (Lietha et al 2001). L'HGF/SF se lie également aux Héparanes Sulfates Protéoglycanes (HSPG) qui jouent un rôle de co-récepteurs de faible affinité favorisant ainsi sa liaison au récepteur MET et l'induction des réponses biologiques (Lyon et al 1994, Sakata et al 1997). Par ailleurs, il a été démontré que MET lui-même liait les HSPG mais avec une affinité 10 fois inférieure à celle du variant de l'HGF/SF, le NK1 (Rubin et al 2001).

B.1.2. La nucléoline :

Il a été montré que l'HGF/SF interagit avec la nucléoline. Bien que cette protéine ait été identifiée en premier lieu au niveau nucléaire, elle est également présente à la surface membranaire où elle interagit avec des facteurs de croissance liant l'héparine. Elle est également connue pour jouer un rôle dans la tumorigenèse. En effet, l'expression de la nucléoline durant la progression cancéreuse prostatique augmente et il a été démontré qu'elle interagissait avec l'HGF/SF favorisant ainsi les propriétés migratrices des cellules prostatiques (Tate et al 2006).

B.2. Réseau membranaire :

B.2.1. CD44 :

Par ailleurs, MET est capable d'interagir avec de nombreux acteurs situés à la membrane. En effet, il a été décrit qu'il interagissait notamment avec certaines isoformes de CD44. Ce récepteur à l'acide hyaluronique, initialement identifié comme protéine d'adhésion à la matrice extracellulaire, est également capable d'agir comme co-

récepteur de MET et réguler ses réponses (Ponta et al 2003) (figure 5). En effet, l'isoforme CD44v3 interagit avec l'HGF/SF et favorise son interaction avec MET, permettant la phosphorylation de ce dernier et l'activation de voies de signalisation comme la voie MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) et PI3K (*Phosphatidyl Inositol 3 Kinase*)/AKT (van der Voort et al 1999, Wielenga et al 2000). Quant à l'isoforme CD44v6, son action s'articule sur deux niveaux. En effet, sa partie extracellulaire permet la formation d'un complexe ternaire entre MET, l'HGF/SF et CD44v6 alors que sa partie intracellulaire est impliquée dans le recrutement des protéines ERM (Ezrines, Radixines et Moesines) et leur assemblage avec la partie C-terminale du récepteur MET. Les protéines ERM favorisent par la suite l'activation de la protéine RAS et la voie MAPK en s'associant à l'actine du cytosquelette (Orian-Rousseau et al 2002, Orian-Rousseau et al 2007).

La relevance physiologique des interactions entre les protéines CD44 et MET a été démontrée dans des modèles murins. En effet, alors que des souris *cd44*^{-/-}, ou invalidées pour un seul allèle de *met* ou de *hgf/sf* sont viables, le cumul de ces invalidations (*cd44*^{-/-} et *met*^{-/+} ou *cd44*^{-/-} et *hgf/sf*^{-/+}) induit la mort des embryons à la naissance causée par une dérégulation de la transmission synaptique et des altérations au niveau du nerf phrénique (Matzke et al 2007).

B.2.2. Les intégrines :

Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion cellulaire. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires impliquées dans l'adhésion cellule-cellule ou cellule-matrice. Le récepteur MET interagit avec certaines d'entre elles, notamment l'intégrine $\alpha\beta_4$, principal constituant des hémidesmosomes, jonctions permettant de relier les cellules épithéliales à la matrice extracellulaire (figure 5). Cette interaction a été décrite dans des lignées issues de carcinomes et favorise la migration cellulaire. En effet, l'activation du récepteur MET par l'HGF/SF induit la phosphorylation de la sous-unité β de l'intégrine sur des résidus tyrosines créant des sites de recrutement pour la PI3K, SHC (*SH2 domain containing transforming protein*), et SHP2 (*SH2 domain containing protein-tyrosine Phosphatase*) mais également la dissociation des hémidesmosomes. Ainsi, cette intégrine joue le rôle d'une protéine adaptatrice supplémentaire du

récepteur MET (Bertotti et al 2006, Comoglio et al 2003, Trusolino et al 2001, Wilhelmsen et al 2006).

B.2.3. La E-cadhérine :

MET interagit directement avec la E-cadhérine, une protéine nécessaire aux jonctions des cellules entre elles. En effet, suite à une stimulation par l'HGF/SF, les propriétés migratoires des cellules sont renforcées suite à l'endocytose conjointe de MET et de la E-cadhérine diminuant ainsi l'adhésion des cellules entre elles (Hiscox and Jiang 1999, Kamei et al 1999, Reshetnikova et al 2007).

B.2.4. La Tensine 4 :

La Tensine 4 est une protéine transmembranaire dont l'interaction avec MET favorise la stabilisation du récepteur. En effet, il a été démontré dans différentes lignées (comme celles issues du cancer du poumon) que MET recrutait la tensine 4. Cette interaction stabilise le récepteur et limite sa dégradation lysosomale et de ce fait régule positivement la survie, prolifération et migration cellulaires. Par ailleurs, l'expression de la tensine 4 est corrélée à celle de MET dans le cancer du côlon et les cancers ovariens suggérant que cette protéine participe à la surexpression de MET *in vivo* (Muharram et al 2014).

B.2.5. Les plexines et leurs ligands les sémaphorines :

Les plexines sont des récepteurs transmembranaires pour les sémaphorines qui sont impliqués dans un grand nombre de fonctions biologiques dont la migration cellulaire. Ces récepteurs et leurs ligands possèdent tous un domaine SEMA homologue à celui de MET. Il a été démontré que le domaine SEMA de MET interagissait avec la plexine B1 (figure 5) (Gherardi et al 2004, Neufeld et al 2012).

En effet, la plexine B1 et MET peuvent physiquement s'associer par leur domaine SEMA. Ainsi, l'activation de la plexine B1 par son ligand, la sémaphorine 4D, permet l'activation du récepteur MET en absence de l'HGF/SF ainsi que l'activation des réponses

biologiques de migration et d'invasion. De plus, en absence de MET, les réponses cellulaires à la sémaphorine 4D sont inhibées faisant de MET un relai pour l'activité du couple plexine B1/sémaphorine 4D (Conrotto et al 2004, Conrotto et al 2005, Giordano et al 2002). Par ailleurs, dans les cancers du sein et de l'ovaire, la co-expression de MET et de la plexine B1 est associée à des tumeurs plus agressives (Valente et al 2009). A l'inverse, l'association de MET à la plexine B1 a mené, dans des lignées issues de mélanomes, à une inhibition de la migration et de l'invasion induites par MET. En effet, dans ces lignées, l'association de la plexine B1 à MET n'induit pas son activation mais le désensibilise à l'HGF/SF. Ces résultats suggèrent une coopération de nature différente entre la plexine B1 et MET en fonction du type cellulaire (Soong et al 2012, Soong and Scott 2013, Stevens et al 2010).

B.2.6. Les autres RTK :

Enfin, MET est capable de dialoguer avec d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase comme l'EGFR et RON (Récepteur d'Origine Nantais). Ces dialogues régulent différentes situations physiologiques et/ou pathologiques et ont lieu grâce à une interaction directe ou de manière indirecte *via* des connections entre les voies de signalisation en aval (figure 5). Ces réactions croisées étant observées principalement dans le cadre du cancer, je les décrirai plus tard dans l'introduction (paragraphe E.5. page 73).

B.2.7. Interaction entre le récepteur de mort FAS et le récepteur de survie MET :

L'apoptose peut être induite suite à l'activation du récepteur FAS (*Fibroblast Associated*), de la famille des TNF (*Tumor Necrosis Factor*), par son ligand le FAS-L. Cette activation mène à la trimérisation du récepteur et au recrutement du complexe DISC (*Death Inducing Signaling Complex*) au niveau de la partie intracellulaire C-terminale du récepteur. Ce complexe induit l'activation de caspases initiatrices puis de l'apoptose (Galluzzi et al 2012). Cependant, le récepteur de mort FAS a un garde-fou : le récepteur MET. En effet, en se liant sur FAS, MET prévient la fixation du FAS-L et de ce fait l'apoptose (figure 5). Cet effet est inhibé par l'ajout d'HGF/SF qui induirait une

dissociation entre MET et FAS. De ce fait, en utilisant un anticorps anti-FAS (Jo2) dans des souris, celles-ci sont plus résistantes à l'insuffisance hépatique induite par Jo2 quand elles surexpriment la partie extracellulaire de MET (Shimizu et al 2001, Smyth and Brady 2005, Wang et al 2002).

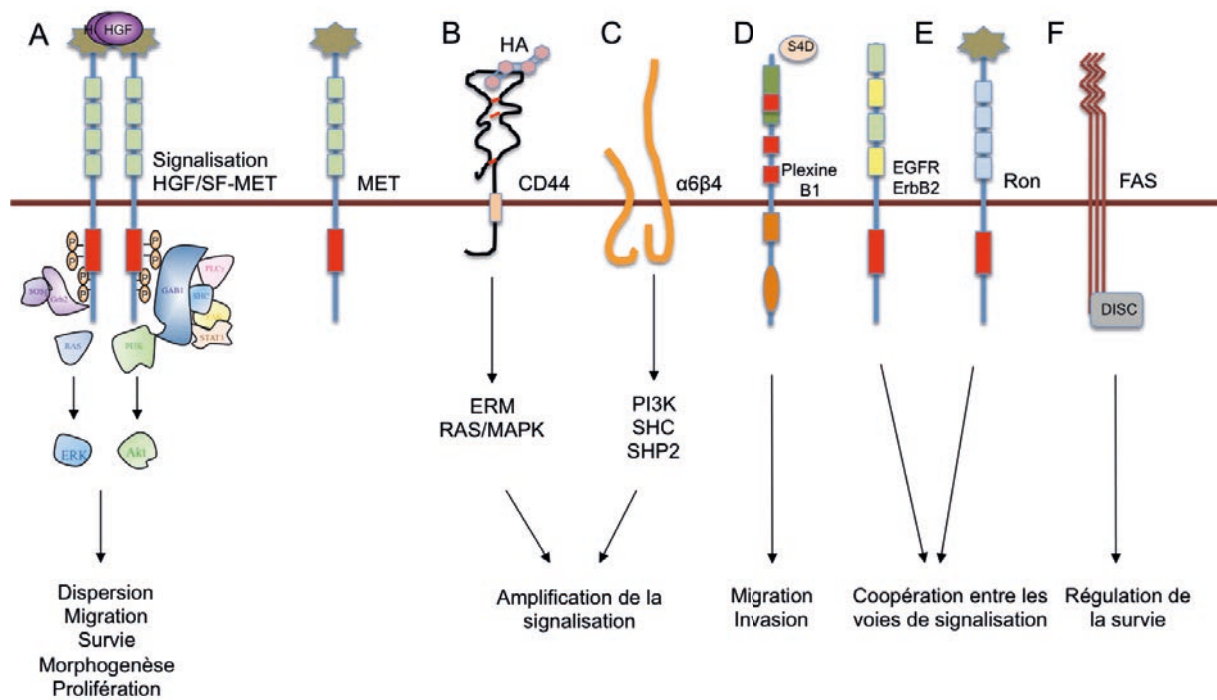


Figure 5 - Les partenaires membranaires de MET. Inspiré de (Viticchie and Muller 2015).

(A) Activation de MET et signalisation induite par HGF/SF-MET. (B) Interactions de MET avec des membres de la famille du CD44, récepteur de l'acide hyaluronique (HA) et (C) l'intégrine $\alpha6\beta4$, menant à l'amplification de sa signalisation. (D) Interaction de MET avec la plexine B1, menant à une augmentation de l'invasion et de l'angiogénèse. (E) Interaction de MET avec d'autres RTK comme l'EGFR et RON menant à une coopération entre les voies de signalisation. (F) Interaction de MET avec le récepteur de mort FAS menant à une régulation de la survie et une diminution de l'apoptose.

B.3. Réseau intracellulaire :

B.3.1. Activation des voies de signalisation en aval de MET :

B.3.1.1. Activation du récepteur MET : les molécules mises en jeu :

Suite à l'activation du récepteur par son ligand, une cascade de phosphorylations a lieu (figure 6). Cette cascade débute par la phosphorylation des résidus tyrosines 1234

et 1235 du domaine kinase de MET. Ces phosphorylations mènent à une stabilisation de la kinase dans sa confirmation active qui va par conséquent favoriser la phosphorylation d'autres résidus, notamment les tyrosines Y1349 et Y1356 de la région C-terminale du récepteur, responsables du recrutement de plusieurs partenaires comme GAB1 (*GRB2-Associated Binder1*) GRB2, SHC et la sous unité p85 de la PI3K. Les Y1349 et Y1356 sont requises pour la signalisation induite par MET. En effet, la substitution de ces deux tyrosines par des phénylalanines n'affecte pas l'activité kinase du récepteur mais inhibe la prolifération, l'invasion et la motilité (Bardelli et al 1997, Ponzetto et al 1994, Zhu et al 1994). Par ailleurs, des souris dans lesquelles la forme sauvage de MET est remplacée par une forme mutée sur ces deux résidus Y1349 et Y1356 (*knock in* ou KI) meurent *in utero* en présentant un phénotype similaire aux souris invalidées pour MET (*knock out* ou KO) (Maina et al 1996). Néanmoins, une étude a démontré qu'une mutation sur ces résidus n'empêchait pas la dispersion des cellules induite par l'HGF/SF-MET, suggérant que cet effet ne soit pas dépendant du site de recrutement multi-substrats (Tulasne et al 1999).

Les tyrosines phosphorylées du récepteur sont spécifiquement reconnues par des domaines de protéines adaptatrices comme le domaine SH2 (*Src Homology 2*) pour par exemple GRB2 (Boccaccio et al 1998, Fixman et al 1996, Ponzetto et al 1994) ou PTB (*PhosphoTyrosine Binding*) pour SHC (Zhou et al 1995). La plus étudiée de ces protéines multi-adaptatrices est principalement la protéine GAB1 qui amplifie le signal de MET et initie la signalisation intracellulaire à l'origine des effets biologiques observés (figure 6).

B.3.1.2. Principaux partenaires de MET :

B.3.1.2.a. Notion de protéine adaptatrice :

Dans le but d'assurer un signal spécifique et efficace, plusieurs mécanismes de régulation sont mis en place au niveau du récepteur. Ces régulations nécessitent des protéines dites adaptatrices qui sont dénuées d'activité catalytique et qui coordonnent et régulent l'action des protéines effectrices (enzymes et facteurs de transcription). Leurs actions mènent ainsi à l'amplification du signal du récepteur en favorisant l'activation et/ou modulation des voies de signalisation en aval (Brummer et al 2010).

B.3.1.2.b. Exemple de GAB1 :

GAB1 (*GRB2-associated-binding protein 1*) est recrutée de manière directe grâce à une séquence de 13 acides aminés contenus dans son site MBD (*MET Binding Domain*) et exposée suite à la phosphorylation de la tyrosine Y1349 (Schaeper et al 2000, Weidner et al 1996) et de manière indirecte *via* une interaction avec GRB2, lui-même recruté par la tyrosine Y1356 (Fixman et al 1997). Des souris KO pour GAB1 meurent *in utero* et présentent un phénotype très similaire à celui des souris déficientes (KO) pour MET ou l'HGF/SF démontrant que GAB1 est un partenaire majeur, nécessaire à plusieurs processus physiologiques induits par MET (Sachs et al 2000). Ainsi, GAB1, sert de plateforme de recrutement pour plusieurs protéines : PI3K, SHP2, PLC γ (*PhosphoLipase C γ*), GRB2 ou SHC, chacune à la base d'une voie de signalisation (Garcia-Guzman et al 1999, Lock et al 2000, Lock et al 2003, Maroun et al 2000, Schaeper et al 2000).

B.3.1.2.c. Autres partenaires : GRB2

GRB2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), tout comme GAB1, est une protéine adaptatrice qui se lie à MET de deux manières. En effet, elle est recrutée de manière directe sur la tyrosine Y1356 par l'intermédiaire de son domaine SH2 ou de manière indirecte par une autre protéine multi-adaptatrice SHC (Pelicci et al 1995). Une étude a démontré l'importance de GRB2 en générant des souris KI exprimant un récepteur MET incapable de recruter GRB2 mais toujours capable de recruter ses autres effecteurs. Ces souris meurent quelques semaines après leur naissance en présentant un défaut de développement des muscles des membres (Maina et al 1996).

B.3.1.3. Les voies de signalisations intracellulaires :

Nous avons vu que le récepteur MET est capable de recruter différentes protéines adaptatrices lui permettant d'amplifier et diversifier son signal. L'activation du récepteur mène donc à différents effets biologiques *via* des cascades de signalisation comme par exemple les voies PLC γ , FAK (*Focal Adhesion Kinase*) ou STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). Néanmoins, les plus caractérisées de ces

cascades sont les voies PI3K/AKT et MAPK/ERK que je prendrai en exemple pour illustrer l'activation des voies de signalisation (figure 6).

B.3.1.3.a. La voie PI3K/AKT :

La protéine PI3K est recrutée soit de manière directe par MET ou par l'intermédiaire de GAB1 (Ponzetto et al 1994). Il s'agit d'une protéine composée d'une sous-unité p110 qui porte l'activité catalytique et d'une autre sous-unité p85 régulatrice qui interagit avec le récepteur MET (Vanhaesebroeck et al 2005). Lorsqu'elle est activée, la PI3K, qui est une enzyme à activité lipide kinase, phosphoryle le PIP₂ (*Phosphatidyl Inositol (4, 5) biPhosphate*) pour former le PIP₃ (*Phosphatidyl Inositol (3, 4, 5) triPhosphate*) qui agit comme un second messenger membranaire lipidique. Le PIP₃ a son tour favorise le recrutement à la membrane plasmique des protéines contenant un domaine PH (*Pleckstrin Homology domain*) comme la protéine AKT, une sérine-thréonine kinase principalement impliquée dans la survie cellulaire (Xiao et al 2001). L'ancrage d'AKT à la membrane conduit à son activation par la kinase membranaire PDK1 (*3-Phospho Inositide Dependent Protin Kinase-1*). AKT activé peut alors phosphoryler des résidus sérines et thréonines des protéines pro-apoptotiques comme BAD (*Bcl2-Associated Death Promoter*), IKK (*IκB Kinase*) et la pro-caspase 9. Ces phosphorylations par AKT conduisent à leur inhibition, favorisant ainsi la survie cellulaire (Fresno Vara et al 2004).

B.3.1.3.b. La voie des MAPK/ERK :

Cette voie fait intervenir un ensemble complexe d'acteurs en cascades. La voie débute avec la liaison de GRB2 sur le domaine C-terminal de MET comme décrit précédemment. GRB2 est constitutivement associé à la protéine SOS (*Son of Sevenless*) qui est un échangeur de guanidine. Ainsi, le complexe GRB2-SOS active Ras, une protéine G membranaire. S'ensuit alors une cascade de phosphorylations. En effet, Ras phosphoryle RAF qui phosphoryle à son tour MEK1 (*MAP/ERK Kinase 1*) qui va phosphoryler les protéines ERK (*Extracellular Signal -Regulated Kinase*) (Li et al 1993, Ponzetto et al 1994). ERK permet, entre autres, le réarrangement du cytosquelette ainsi que l'activation de facteurs de transcription comme c-Fos et ETS1 (*Avian*

Erythroblastosis Virus E26 homolog-1). Ces activations permettant notamment la progression dans le cycle cellulaire et donc la prolifération (Chambard et al 2007, Furge et al 2000, Tulasne et al 2002).

B.3.1.3.c. Interconnexion des voies de signalisation :

Diverses études ont tenté d'associer certaines voies de signalisation à une réponse biologique précise. Par exemple, la voie PI3K est plus souvent associée à la survie cellulaire alors que celle des MAPK est associée à la prolifération. SHC est nécessaire à l'angiogenèse (Saucier et al 2004), PLC γ à la morphogenèse (Gual et al 2000), Src à la croissance sans ancrage (Rahimi et al 1998) et FAK à la migration et l'invasion (Chen and Chen 2006). Cependant, il a été démontré que les voies de signalisation de MET étaient très souvent interconnectées et participent de manière conjointe et coordonnée aux réponses biologiques induites par le récepteur. En effet, un effecteur peut être impliqué dans l'activation de protéines de différentes voies. Par exemple, l'activation de RAS peut activer AKT en plus de la voie MAPK/ERK (Coltella et al 2006, Recio and Merlino 2002, Rodrigues et al 1997). Par ailleurs, une voie de signalisation n'est pas restreinte à une seule réponse mais peut être impliquée dans plusieurs réponses biologiques. Par exemple, la voie des MAPKinases est non seulement impliquée dans la prolifération mais elle est également nécessaire pour les réponses de survie, de motilité ou de morphogenèse (Kermorgant and Parker 2005, O'Brien et al 2004, Xiao et al 2001). De plus, plusieurs voies peuvent être impliquées pour induire un même effet biologique. Par exemple, l'activation des voies MAPK/ERK, PI3K/AKT, SHP2 et STAT 3 sont nécessaires pour la morphogenèse. L'interconnexion des voies de signalisation a été démontrée *in vivo*. En effet, le remplacement chez la souris du MET sauvage par des formes mutées recrutant préférentiellement la PI3K, Src ou GRB2 a montré des conséquences sur plusieurs étapes du développement. Ceci démontre que toutes les voies de signalisation du récepteur MET sont nécessaires à sa pleine action *in vivo* (Maina et al 2001, O'Brien et al 2004, Rosario and Birchmeier 2003, Trusolino et al 2010).

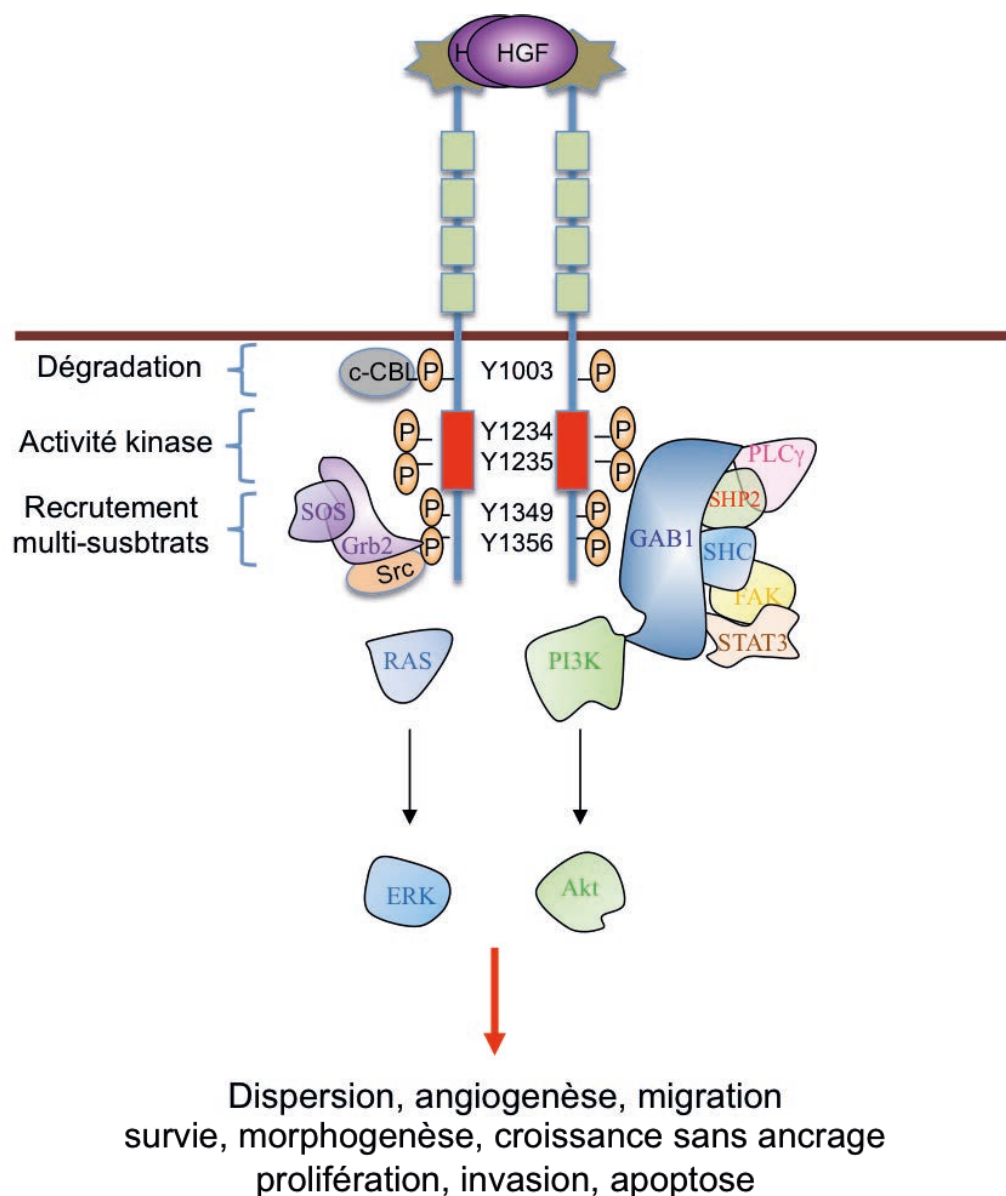


Figure 6 - Partenaires recrutés et réponses biologiques induites par MET.

Le récepteur MET, activé par son ligand, le HGF/SF, peut activer plusieurs voies de signalisation et induire diverses réponses biologiques. En effet, MET recrute plusieurs protéines adaptatrices comme GAB1, GRB2 menant au recrutement de plusieurs effecteurs et à l'activation des voies de signalisation comme les voies PI3K/AKT et MAPK/ERK. Ces voies mènent à divers effets biologiques comme la survie, la migration, la dispersion et la morphogenèse.

B.3.2. Internalisation du récepteur MET :

L'activation de MET par l'HGF/SF conduit à son internalisation rapide par endocytose. En cours d'internalisation, le récepteur continue d'induire certaines voies de signalisation. En effet, dans les endosomes précoces, MET continue d'induire l'activation des protéines ERK1/2 puisque l'utilisation d'un inhibiteur de l'internalisation (concanavalin A) a mené à une inhibition de la phosphorylation des

protéines ERK (Kermorgant et al 2004). Il a également été démontré que MET induit la relocalisation des protéines ERK au niveau des points focaux d'adhésion *via* la PKC ϵ , favorisant ainsi la migration induite par l'HGF/SF. En effet, une perte ou une inhibition de la PKC ϵ induit une baisse de phospho-ERK1/2 au niveau des points focaux ainsi qu'une inhibition de la migration cellulaire (figure 7) (Kermorgant et al 2004, Kermorgant and Parker 2005, Liu et al 2002). De plus, toujours au niveau des endosomes précoces, une étude a démontré dans des cellules issues du cancer du sein que MET activait la protéine G Rac1, membre de la famille des Rho GTPases. L'activation de Rac1 permet un remodelage de l'actine et favorise la migration cellulaire. Cette activation est également maintenue dans les endosomes péri-nucléaires (Menard et al 2014, Palamidessi et al 2008). Par la suite, le récepteur poursuit son chemin depuis les endosomes précoces vers les endosomes péri-nucléaires. Cette progression semble être sous le contrôle de la PKC α qui s'associe aux microtubules et favorise la migration des endosomes le long de ces microtubules vers le compartiment péri-nucléaire (Kermorgant et al 2003, Kermorgant et al 2004). Au niveau des endosomes périnucléaires, MET recrute et active le facteur de transcription STAT3. S'ensuivent la phosphorylation, la dimérisation et la translocation de STAT3 dans le noyau qui lui permettent d'induire la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires (figure 7) (Boccaccio et al 1998, Levy and Darnell 2002).

De ce fait, la signalisation de MET ne s'effectue pas seulement à la membrane cellulaire mais se poursuit au cours de son internalisation dans différents compartiments intracellulaires. De plus, cette signalisation ainsi que les effecteurs mis en jeu dépendent de la localisation du récepteur suggérant un recrutement préférentiel menant à une spécificité du signal de MET.

B.4. Dégradation du récepteur MET :

Même si, comme nous venons de le voir, l'internalisation de MET est un phénomène important pour sa signalisation, elle est depuis longtemps connue pour être une étape de la dégradation du récepteur menant à l'arrêt de son signal. Cette dégradation peut s'opérer soit de manière dépendante ou indépendante du ligand.

B.4.1. Dégradation dépendante du ligand :

L'inactivation du récepteur passe notamment par la phosphorylation de la tyrosine Y1003 située au niveau du domaine juxtamembranaire de MET (Peschard et al 2001, Weidner et al 1995). En effet, suite à l'activation du récepteur, cette tyrosine est phosphorylée ce qui mène au recrutement de la E3 ubiquitine ligase c-CBL (*Casitas B-cell Lineage*), connue pour être impliquée dans la dégradation de plusieurs RTK. Phosphorylée, c-CBL favorise une ubiquitination du récepteur sur plusieurs résidus menant à l'internalisation de MET. c-CBL recrute également la protéine CIN-85 (*Cbl-Interacting Protein of 85 kDa*) qui s'associe aux endophilines, protéines régulant les clathrines. Endophilines et clathrines permettent alors l'incurvation et l'invagination de la membrane donnant au final des vésicules individualisées appelées endosomes précoces dans lesquelles MET est internalisé (figure 7) (Hammond et al 2001, Peschard et al 2001, Petrelli et al 2002, Ponzetto et al 1994, Taher et al 2002).

Dans ces endosomes, la mono-ubiquitination de MET permet sa reconnaissance par la protéine HRS (*HGF Regulated tyrosine kinase Substrate*) puis par le complexe protéique ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). Cette interaction permet l'invagination des endosomes donnant naissance à des vésicules intra-luminales (VIL) renfermées dans ce qu'on appelle un endosome multivésiculaire (EMV). Cet EMV évolue par la suite en un endosome tardif (figure 7). L'endosome tardif fusionne alors avec un lysosome dont le pH acide permet la dégradation de MET, aux côtés d'autres protéines et lipides, par des protéases actives en pH acide, ce qui permet l'arrêt définitif de la signalisation du récepteur (figure 7) (Abella et al 2005, Hammond et al 2001, Komada and Kitamura 1995, Tanaka et al 2008, Trusolino et al 2010).

Il est intéressant de noter que l'endocytose de MET peut également mener à son recyclage à la membrane. En effet, au niveau des endosomes, MET activé s'associe avec la protéine GGA3 (*Golgi-localized γ -ear-containing Arf-binding protein 3*) via l'adaptateur CRK (*CT10 (chicken tumor virus number 10) Regulator of Kinase*). L'implication de GGA3 dans le recyclage de MET a été démontrée en effectuant une inactivation (*knockdown* ou *silencing*) de GGA3. Ces *knockdown* ont mené à une inhibition du recyclage du récepteur et à une augmentation de sa dégradation. Cette inhibition est associée à une diminution

de l'activation de ERK et de la migration cellulaire. Ceci démontre que le recyclage de MET participe également au contrôle de la signalisation du récepteur (Lefebvre et al 2012, Parachoniak et al 2011).

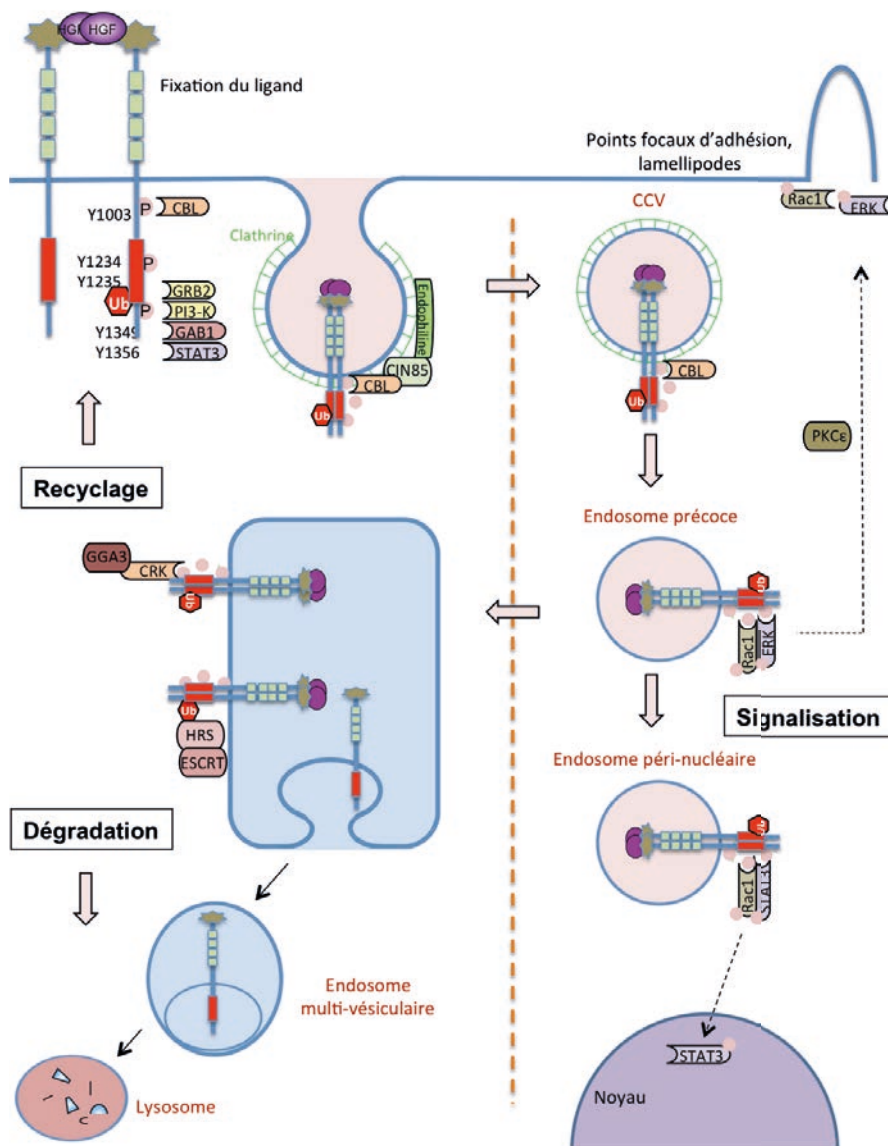


Figure 7 – Internalisation, recyclage et dégradation du récepteur MET. Tiré de (Barrow-McGee and Kermorgant 2014, Lefebvre et al 2012).

Après fixation de son ligand, le récepteur MET est phosphorylé sur les résidus tyrosine Y1003 du domaine juxtamembranaire, Y1234 et Y1235 du domaine kinase et Y1349 et Y1356 du domaine C-terminal. Les phosphorylations au niveau du domaine C-terminal mènent au recrutement de protéines de signalisation telles que GRB2, GAB1, PI3K et STAT3. Le recrutement de c-CBL s'effectue *via* la Y1003 qui mène à l'ubiquitination (Ub) de MET. Le récepteur ubiquitiné est alors internalisé du fait du recrutement par c-CBL de CIN-85 (*Cbl-Interacting Protein of 85 kDa*) qui s'associe aux endophilines. Celles-ci régulent les clathrines enveloppant les vésicules et permettent l'incurvation et l'invagination de la membrane donnant des endosomes précoces. Dans ces endosomes, le récepteur ubiquitiné est reconnu par la HRS (*HGF Regulated tyrosine kinase Substrate*) et le complexe ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). A ce niveau MET peut soit être dégradé avec la formation des endosomes multivésiculaires puis des endosomes tardifs qui fusionnent avec les lysosomes permettant ainsi sa dégradation. MET peut également être recyclé à la membrane suite à son interaction avec GGA3 (*Golgi-localized γ -ear-containing Arf-binding protein 3*) via CRK (*CT10 (chicken tumor virus number 10) Regulator of Kinase*). Par ailleurs, au niveau des endosomes précoces, MET est capable d'induire une signalisation par exemple en recrutant et activant le facteur de transcription STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) qui se dimérise et se transloque dans le noyau. De plus, MET est capable d'induire l'activation et la relocalisation de ces protéines ERK et Rac1 au niveau des points focaux d'adhésion et des lamellipodes *via* la PKC ϵ .

B.4.2. Dégradation indépendante du ligand :

B.4.2.1. Dégradation de MET par des protéines contenant des régions riches en leucines :

D'autres mécanismes permettent la dégradation du récepteur de manière indépendante de son ligand. Ces mécanismes impliquent notamment la décorine et LRIG1 (*Leucine-rich Repeats and ImmunoGlobulin-like Domains 1*). Concernant la décorine, protéoglycane extracellulaire appartenant à la famille des SLRP (*Small Leucine-Rich Proteoglycan*), elle induit la dégradation de MET *via* deux mécanismes. D'une part, en induisant sa phosphorylation sur la Y1003 et donc sa dégradation après recrutement de la protéine c-CBL sans induire la phosphorylation du site de recrutement C-terminal (Y1349 et Y1356) donc sans induire de signalisation (figure 8 partie I). D'autre part, la décorine favorise le clivage de MET par les métalloprotéases membranaires de la famille des ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) séparant le domaine extracellulaire du récepteur de son domaine kinase (Goldoni et al 2009).

Quant à LRIG1, une protéine transmembranaire contenant aussi des répétitions riches en leucines, son *knockdown* augmente la demi-vie de MET indiquant que cette protéine joue un rôle dans la dégradation du récepteur. Néanmoins, son mécanisme d'action sur MET est encore mal connu mais s'opère de manière indépendante du ligand et du recrutement de c-CBL (figure 8 partie I) (Shattuck et al 2007).

Par ailleurs, la protéine bactérienne internaline B (Inlb) de la *Listeria monocytogenes*, qui possède également un domaine riche en leucines, permet aussi l'activation de MET, son ubiquitination puis son internalisation. Cette interaction est primordiale pour l'entrée du pathogène dans les cellules. En effet, suite à son internalisation, MET est adressé à la dégradation par les lysosomes alors que la bactérie entre dans les cellules (figure 8 partie I) (Shen et al 2000, Veiga and Cossart 2005).

De façon intéressante, trois protéines possédant des domaines riches en leucines sont capables d'induire la dégradation du récepteur MET suggérant que ces domaines jouent un rôle central dans ces processus. Cependant, les mécanismes de dégradation

sont différents entre ces protéines. Il serait donc intéressant d'approfondir nos recherches en étudiant l'interaction du récepteur avec ces domaines riches en leucine ce qui nous permettra de mieux comprendre leur implication dans la dégradation de MET (Lefebvre et al 2012).

B.4.2.2. Dégradation de MET par des clivages protéolytiques :

MET peut également être dégradé par des clivages protéolytiques. Ces clivages interviennent dans une grande variété de situations et permettent de réguler efficacement son expression.

- clivages régulateurs de la demi-vie de MET :

Ainsi, indépendamment de tout traitement ou stimulation, MET est clivé dans sa région extracellulaire proche de la membrane de façon constitutive par les métalloprotéases membranaires de la famille des ADAM. Ce clivage génère un fragment extracellulaire appelé MET-NTF (*N-Terminal Fragment*) ou MET soluble et un fragment intracellulaire appelé MET-CTF (*C-Terminal Fragment*). Le fragment MET-CTF généré subit un deuxième clivage par la γ -sécrétase menant à un fragment appelé MET-ICD (*IntraCellulaire Domain*) qui sera dégradé par le protéosome. Ce processus est nommé PS-RIP (*PreSenilin-dependent Regulated Intramembrane Proteolysis*) (Foveau et al 2009, Schelter et al 2010). Le clivage de MET par les métalloprotéases peut également avoir lieu au niveau des endosomes conduisant cette fois à la dégradation des fragments par le lysosome (figure 8 partie II) (Ancot et al 2012). Ces clivages ayant lieu de façon constitutive, ils sont impliqués dans la régulation de la demi-vie du récepteur.

- clivages en conditions de stress :

En conditions de stress, il existe également différents mécanismes de dégradation de MET. En effet, MET est dégradé par les caspases en conditions apoptotiques au niveau de deux sites : l'acide aspartique D1002 dans le domaine juxtamembranaire du récepteur et l'acide aspartique D1374 dans sa partie C-terminale. Le clivage sur l'acide D1002 génère un fragment toujours ancré à la membrane (p100 MET) et un fragment

intracellulaire (p40 MET caspase) ayant une activité pro-apoptotique. En effet, ce fragment peut se localiser dans les mitochondries et favoriser leur perméabilisation et donc la libération du cytochrome c dans le cytoplasme. Quant au clivage sur l'acide aspartique D1374, il permet le retrait de quelques acides aminés à l'extrémité C-terminale du récepteur, ce qui est nécessaire à l'action pro-apoptotique du p40 MET caspase (Foveau et al 2007, Lefebvre et al 2013, Tulasne et al 2004). MET est également dégradé par les calpaïnes en conditions nécrotiques générant dans ce cas un fragment intracellulaire (p40 MET calpain). En revanche, contrairement au fragment généré par les caspases (p40 MET caspase) qui est pro-apoptotique, celui généré par les calpaïnes (p40 MET calpain) n'a pas de fonction définie jusqu'à présent (figure 8 partie II) (Montagne et al 2015).

En conclusion, la régulation de MET est primordiale pour l'obtention de réponses cellulaires et tissulaires correctes. De ce fait, sa dégradation est assurée par un ensemble de phénomènes complexes. En effet, il existe plusieurs mécanismes de dégradation du récepteur MET. D'une part, en réponse à son ligand, menant ainsi à l'arrêt de sa signalisation. D'autre part, par des partenaires (protéines riches en domaines leucines) ou par des clivages protéolytiques permettant ainsi de réguler sa demi-vie. Et enfin par des clivages dans des conditions de stress (par les caspases et les calpaïnes) conduisant à l'arrêt de sa signalisation et la réorientation de son activité pendant la mort cellulaire (vers une activité pro-apoptotique par exemple suite à un clivage par les caspases). L'ensemble de ces régulations a pour but de maintenir un contrôle précis de l'activité du récepteur.

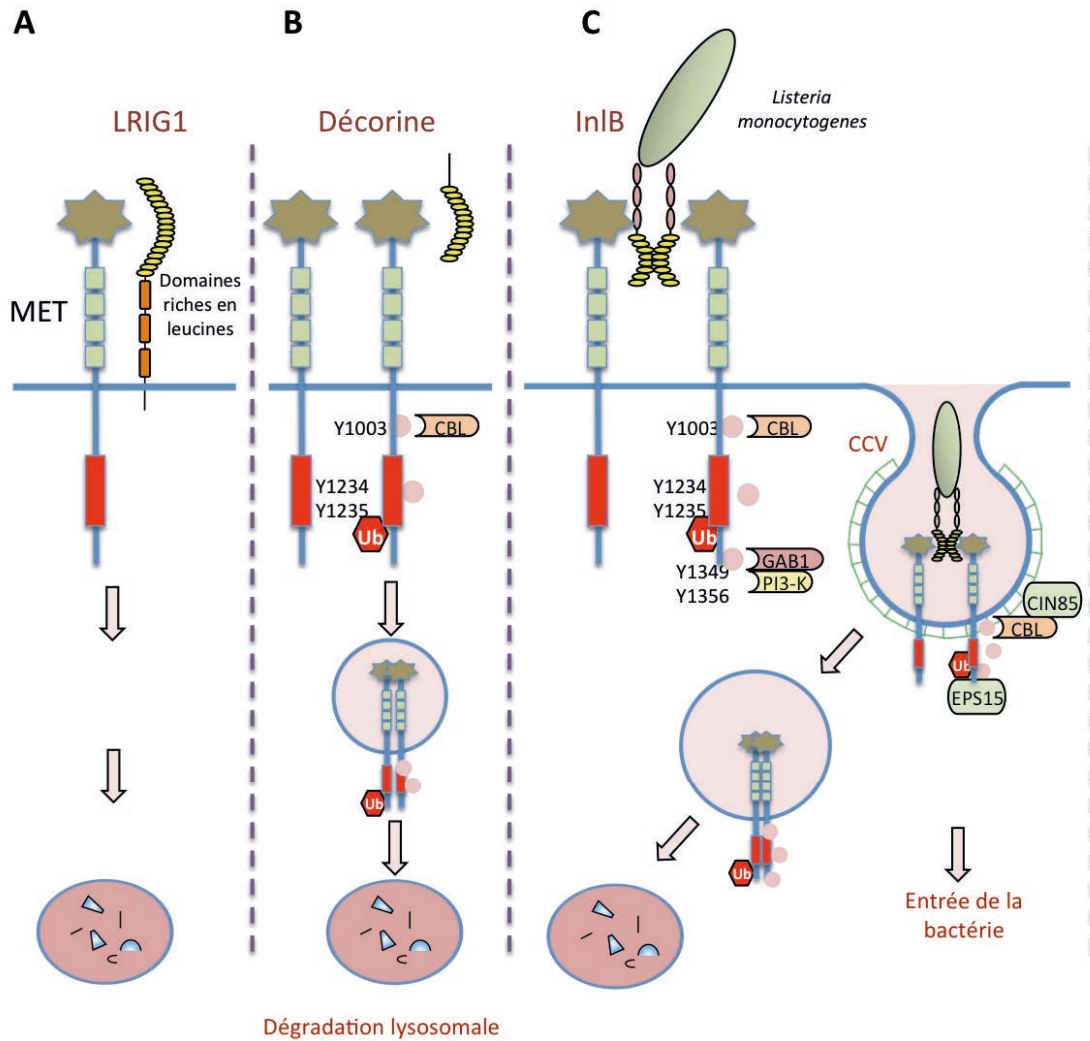


Figure 8 – *Partie I*. Figure schématisant la dégradation de MET de manière indépendante du ligand : dégradation par des protéines contenant des régions riches en leucine (A, B, C). Inspiré de (Lefebvre et al 2012).

Partie I. (A) dégradation de MET par la protéine transmembranaire riche en leucines LRIG1 (*Leucine-rich Repeats and ImmunoGlobulin-like Domains 1*). Son mécanisme d'action sur MET est encore mal connu mais est indépendant du ligand et du recrutement de c-CBL et mène à une dégradation lysosomale. (B) dégradation de MET par la décorine, un protéoglycane extracellulaire riche en leucines. Sa liaison sur MET induit sa phosphorylation partielle notamment sur la Y1003. Ceci mène au recrutement de c-CBL et à la dégradation lysosomale de MET. (C) dégradation de MET par la protéine bactérienne riche en leucines l'internaline B (InIb) de la *Listeria monocytogenes*. La liaison de l'InIb mène à la phosphorylation de MET et à sa pleine activation. Cette interaction mène non seulement à l'ubiquitination puis dégradation lysosomale du récepteur mais également à l'entrée de la bactérie dans les cellules.

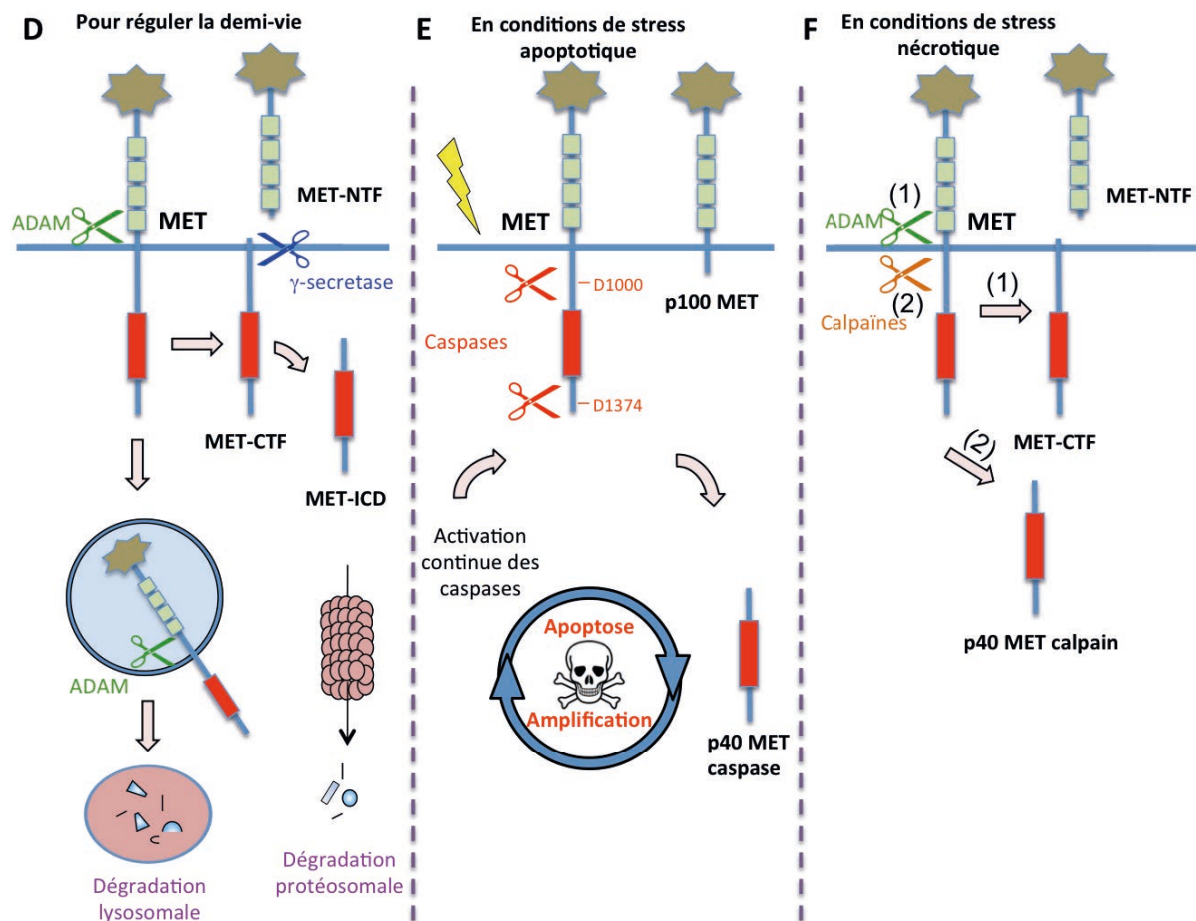


Figure 8 – *Partie II*. Figure schématisant la dégradation de MET de manière indépendante du ligand : dégradation par clivages protéolytiques permettant de réguler sa demi-vie et en conditions de stress apoptotique et nécrotique (D, E, F). Inspiré de (Lefebvre et al 2012) et (Montagne et al 2015).

Partie II. (D) dégradation de MET par clivages protéolytiques en conditions physiologiques. En conditions basales, les métalloprotéases membranaires de la famille ADAM clivent MET générant un fragment extracellulaire (MET-NTF) et un fragment intracellulaire (MET-CTF). Après ce clivage initial, MET-CTF est clivé par la γ-sécrétase donnant un fragment du domaine intracellulaire (MET-ICD). MET-ICD sera par la suite dégradé par le protéasome alors que MET-CTF peut échapper au clivage par la γ-sécrétase *via* une internalisation et un adressage jusqu'au lysosome où il sera dégradé. (E) dégradation de MET par clivages protéolytiques en conditions de stress apoptotique. Dans ces conditions, MET est clivé par les caspases générant un fragment ancré à la membrane (p100 MET) et un fragment intracellulaire (p40 MET) ayant une activité pro-apoptotique. (F) dégradation de MET par clivages protéolytiques en conditions de stress nécrotique. Dans ces conditions, en plus de son clivage par les métalloprotéases de la famille ADAM (1) générant un fragment MET-NTF et un fragment MET-CTF, MET est clivé par les calpaïnes (2) donnant lieu à un fragment intracellulaire (p40 MET calpain) dont la fonction n'a pas été définie jusqu'à présent.

B.5. Inactivation de MET :

Après son activation, le récepteur engage une phase d'inactivation. Différentes voies d'inactivation de MET ont été décrites. Nous venons de voir la première de ces voies et qui concerne la dégradation lysosomale du récepteur (paragraphe B.4 page 37). D'autres voies sont impliquées comme celles de la phosphorylation de la sérine 985 et celle qui implique l'activité de phosphatases.

B.5.1. Rôle de la Sérine 985 :

La sérine 985 est située au niveau du domaine juxtamembranaire de MET. Sa phosphorylation est effectuée par les PKC (*Proteine Kinase C*) δ et ϵ et sa déphosphorylation par la phosphatase PP2A (*Protein Phosphatase 2*). Des études ont montré que cette sérine est impliquée dans la régulation négative du récepteur. En effet, suite à son activation, cette sérine induit une inhibition de l'activité kinase du récepteur MET menant à une inhibition des réponses cellulaires de dispersion et de prolifération liées à une stimulation par de l'HGF/SF (Gandino et al 1994, Hashigasako et al 2004).

B.5.2. Les phosphatases :

B.5.2.1. Rôle des phosphatases :

Les phosphatases sont des enzymes qui déphosphorylent (éliminent un groupement phosphate par hydrolyse) les sérines, thréonines ou tyrosines des protéines. Elles sont responsables de la régulation de multiples processus cellulaires comme la croissance et la migration cellulaires (Wang et al 2009a). L'implication de plusieurs phosphatases a été décrite dans la déphosphorylation du récepteur MET au niveau des résidus tyrosines de son domaine kinase, menant ainsi à une baisse de son activité. Ces phosphatases sont appelées protéines tyrosines phosphatases (PTP) et comptent 38 membres appartenant aux phosphatases « classiques » et regroupées parmi les phosphatases cytosoliques (nPTP pour *non-transmembrane PTP*) ou les « *receptor-like* » phosphatases transmembranaires (rPTP). Elles sont caractérisées par un domaine catalytique conservé d'environ 240 acides aminés contenant un site actif

hautement conservé. Une clé essentielle de ce site actif est un résidu cystéine, contenu dans une séquence V H C S A G et requise pour l'activité catalytique (Sandin et al 2011).

a- PTP1B :

L'implication de cette phosphatase, membre prototype de la famille PTP, a été décrite dans la régulation négative de plusieurs RTK, notamment l'EGFR (Flint et al 1997), le récepteur à l'insuline (Salmeen et al 2000), le PDGFR (Haj et al 2003) et MET.

En 2008, une équipe a démontré que PTP1B était un régulateur négatif du récepteur MET menant à sa déphosphorylation et à l'arrêt de sa signalisation. En effet, l'utilisation *in vitro* de siRNA dirigés contre PTP1B a mené à une augmentation de la phosphorylation des tyrosines Y1234 et 1235 du domaine kinase de MET menant ainsi à une augmentation de l'invasion cellulaire induite par MET. Le rôle de la PTP1B a également été montré *in vivo*, où la perte de cette phosphatase a mené à une augmentation de la phosphorylation du récepteur MET (Sangwan et al 2008).

Par ailleurs, une autre étude a démontré que la PTP1B induisait la déphosphorylation de la NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*), un composant essentiel pour la formation de vésicules endosomales. Le *knock down* de la PTP1B induit une hyper-phosphorylation de la NSF menant à une dérégulation de l'adressage de MET et de l'EGFR (Sangwan et al 2011). De plus, il a été démontré que des cellules primaires hépatocytaires déficientes pour PTP1B étaient résistantes à l'apoptose induite par FAS par l'intermédiaire d'une activation plus importante de la signalisation de MET. Cette résistance a également été démontrée *in vivo* en utilisant des souris PTP1B-*null*. En effet, celles-ci présentaient une apoptose hépatique réduite comparé aux souris sauvages (Sangwan et al 2006).

b- T-Cell Phosphatase :

Tout comme la PTP1B, la T-Cell phosphatase est impliquée dans la déphosphorylation du récepteur MET *in vivo* et *in vitro*. En effet, dans leur étude, Sangwan et ses collaborateurs ont démontré à la fois, et de la même manière, le rôle de

la PTP1B et celui de la T-Cell phosphatase dans la signalisation HGF/SF-MET (Sangwan et al 2008).

c- DEP-1 et RPTP- β :

Il est décrit que la phosphatase DEP-1 (PTP- η) est également impliquée dans la déphosphorylation du récepteur MET. Cette déphosphorylation a lieu préférentiellement au niveau des tyrosines 1349 et 1356 du domaine C-terminal de MET suggérant que cette phosphatase pourrait plutôt avoir une fonction dans le contrôle de la spécificité du signal induit par MET qu'une action sur l'activité kinase elle-même (Palka et al 2003).

Une autre étude a démontré que le *knock down* de la RPTP- β dans des cellules dérivant d'un cancer des voies aérodigestives supérieures a mené à une augmentation de la phosphorylation de MET sur les résidus tyrosine de son domaine kinase. Cette potentialisation de la phosphorylation du récepteur a mené à une activation de la voie des MAPK, de la migration et de l'invasion cellulaires. Par ailleurs, la restauration de l'expression de la RPTP- β a mené à une baisse de la phosphorylation de MET ainsi qu'à une baisse du signal en aval (Xu et al 2012).

d- SHP-2 :

En 2000, Maroun et ses collaborateurs ont démontré que la *Src Homology region 2 domain-containing phosphatase-2* (SHP-2, également appelée PTPN11 pour *Tyrosine-Protein Phosphatase Non-receptor type 11* ou PTP-1D) s'associait avec la protéine multi-adaptatrice GAB1. Cette association est nécessaire pour une activation soutenue de la protéine ERK et pour la morphogénèse induite par l'HGF/SF. En effet, des cellules épithéliales exprimant un GAB1 muté et incapable de recruter SHP-2 a mené à une activation transitoire de ERK en réponse à l'HGF/SF (Maroun et al 2000). Par ailleurs, Duan et al. ont démontré que SHP-2 est nécessaire pour l'activation de la *Sphingosine Kinase-1* (SPK-1), une kinase lipidique qui joue un rôle important dans la migration cellulaire, en plus de son rôle connu dans la dispersion cellulaire induite par l'HGF/SF (Duan et al 2006). De ce fait, il semblerait que SHP-2 ne soit pas impliquée dans la

déphosphorylation du récepteur MET, contrairement aux autres phosphatases décrites dans ce chapitre, mais qu'elle ait un rôle potentialisant de la signalisation HGF/SF-MET.

B.5.2.2. Régulation des phosphatases :

Divers mécanismes de régulation contrôlant l'activité des PTP ont été identifiés comme la phosphorylation, la protéolyse ainsi que la liaison au ligand et la dimérisation (dans le cas des *receptor-like* PTP) (den Hertog et al 2008). Cependant, un mécanisme de régulation supplémentaire a émergé ces dernières années où il a été démontré qu'une oxydation réversible de la cystéine du site actif avait un effet régulateur négatif sur l'activité des phosphatases (Ostman et al 2011) (figure 9). En effet, cette cystéine existe généralement sous la forme d'un anion thiolate, hautement susceptible à l'oxydation par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Denu and Tanner 1998, Tonks 2006). Plusieurs études ont démontré l'existence de l'oxydation de cette cystéine suite à l'activation de récepteurs tyrosines kinases et la génération de ROS, menant ainsi à la baisse d'activité de ces phosphatases (Lee et al 1998, Mahadev et al 2001, Meng et al 2002). Par ailleurs, et de manière intéressante, cette oxydation régulatrice a également été liée à l'hypoxie. En effet, certaines études ont démontré que la PTP1B, la T-Cell phosphatase, DEP-1 et SHP-2 étaient oxydées en hypoxie au niveau de leur domaine catalytique cystéine menant ainsi à une baisse de leur activité et de leur expression de manière HIF1a dépendante. Cette baisse de l'activité des phosphatases a pour conséquence une augmentation de la phosphorylation du PDGFR menant ainsi à une augmentation de la prolifération cellulaire (ten Freyhaus et al 2011). La baisse d'activité des phosphatases a également été observée avec SHP-2 et DEP-1 lors d'une hypoxie suivie d'une réoxygénation (Sandin et al 2011). Ces données suggèrent que les PTP serviraient de cibles moléculaires pour les ROS contribuant ainsi à l'hypothèse de l'existence d'un *cross-talk* entre le stress oxydant et la phosphorylation des tyrosines.

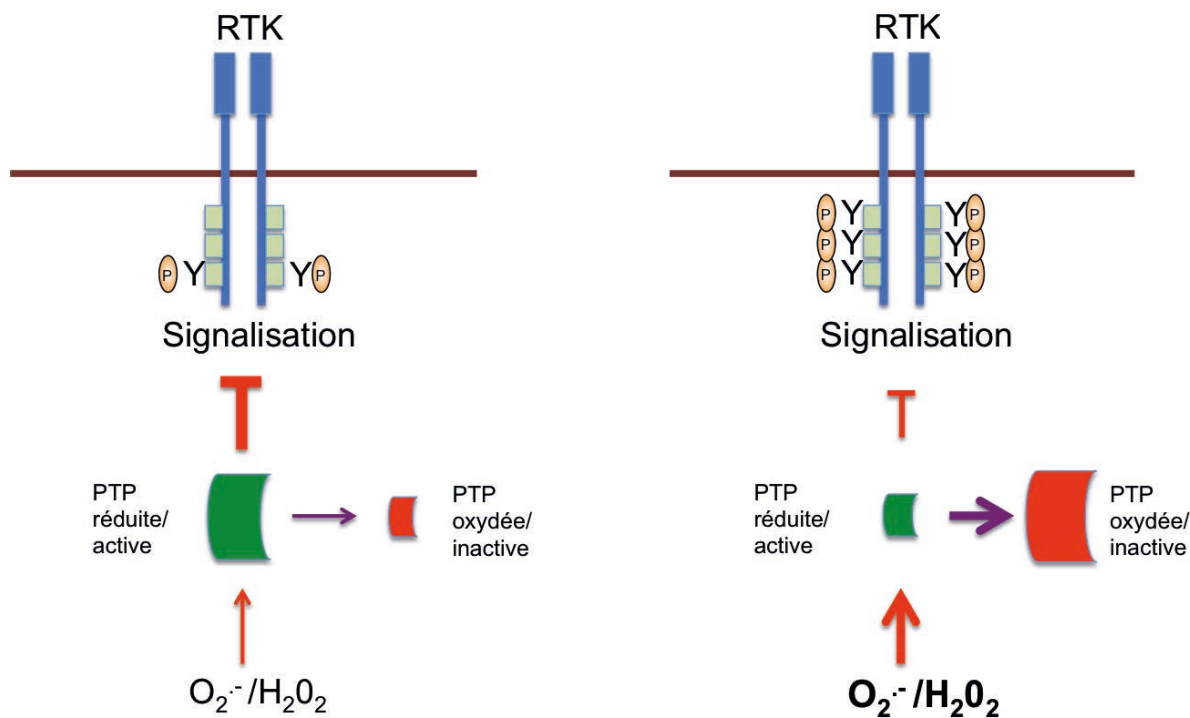


Figure 9 – Crosstalk entre la signalisation des RTK et l’oxydation des PTP par les ROS. Inspiré de (Ostman et al 2011).

Un environnement hautement réducteur dans la cellule (à gauche) mène à une faible oxydation des PTP et une faible signalisation des RTK du fait de la faible présence/activité des producteurs de ROS et/ou de la grande présence/activité des antioxydants (piégeurs des ROS). *A contrario*, un environnement hautement oxydant dans la cellule (à droite) mène à une forte oxydation des PTP et une forte signalisation des RTK du fait de la forte présence/activité des producteurs de ROS et/ou de la faible présence/activité des antioxydants (piégeurs des ROS).

C. Les effets cellulaires et tissulaires de la signalisation HGF/SF-MET :

C.1. Pendant le développement embryonnaire :

MET est largement impliqué dans des processus du développement embryonnaire de nombreux organes (système nerveux central, foie, cœur, muscles, prostate, pancréas) (Schmidt et al 1995).

En effet, il a été démontré chez la souris que lors des premiers stades de l’embryogenèse, au cours de la gastrulation (6.5 à 7 jours de développement), l’HGF/SF et MET sont exprimés de manière conjointe dans l’endoderme et une partie de la ligne primitive du mésoderme indiquant un mode d’action autocrine. Au cours de

l'organogenèse (8 à 10 jours de développement), leur expression conjointe n'a lieu que dans quelques régions (cœur, somites et cellules des crêtes neurales) avant de s'arrêter. En parallèle, un second profil d'expression se met en place avec une expression de MET et de l'HGF/SF dans des contingents cellulaires différents. En effet, tandis que MET est exprimé dans les tissus épithéliaux, l'HGF/SF est secrété par les tissus mésenchymateux, démontrant ainsi l'établissement du dialogue entre ces tissus *via* un mode d'action paracrine (Andermarcher et al 1996, Sonnenberg et al 1993, Wilhelmssen et al 2006).

Il a par ailleurs été établi que des KO (*Knock Out*) de *met* et de *hgf/sf*, effectués dans des souris, étaient létaux dès le 15^{ème} jour de développement en présentant des phénotypes similaires confirmant ainsi le lien fonctionnel entre l'HGF/SF et MET. En effet, en absence de MET ou de l'HGF/SF, les échanges materno-fœtaux deviennent insuffisants du fait d'un défaut d'organisation du trophoblaste labyrinthique du placenta. Ceci mène à un défaut d'approvisionnement en oxygène et en nutriments et conduit à la mort des embryons (figure 10A) (Birchmeier and Gherardi 1998, Uehara et al 1995). Par ailleurs, ces souris présentent une réduction de la taille du foie due à la perte de l'activité prolifératrice de l'HGF/SF et à l'augmentation de l'apoptose (figure 10B) (Schmidt et al 1995). De plus, ces embryons présentent une absence de muscles squelettiques dans le sommet de la langue, le diaphragme et les bourgeons des membres. En effet, MET est exprimé dans les précurseurs myoblastiques du dermomyotome tandis que l'HGF/SF est exprimé dans les bourgeons des membres (figure 9C). L'HGF/SF induit la migration et la prolifération des myoblastes exprimant le récepteur permettant aussi la formation des muscles. L'absence du récepteur ou de son ligand explique donc l'absence de muscles squelettiques observés (Bladt et al 1995).

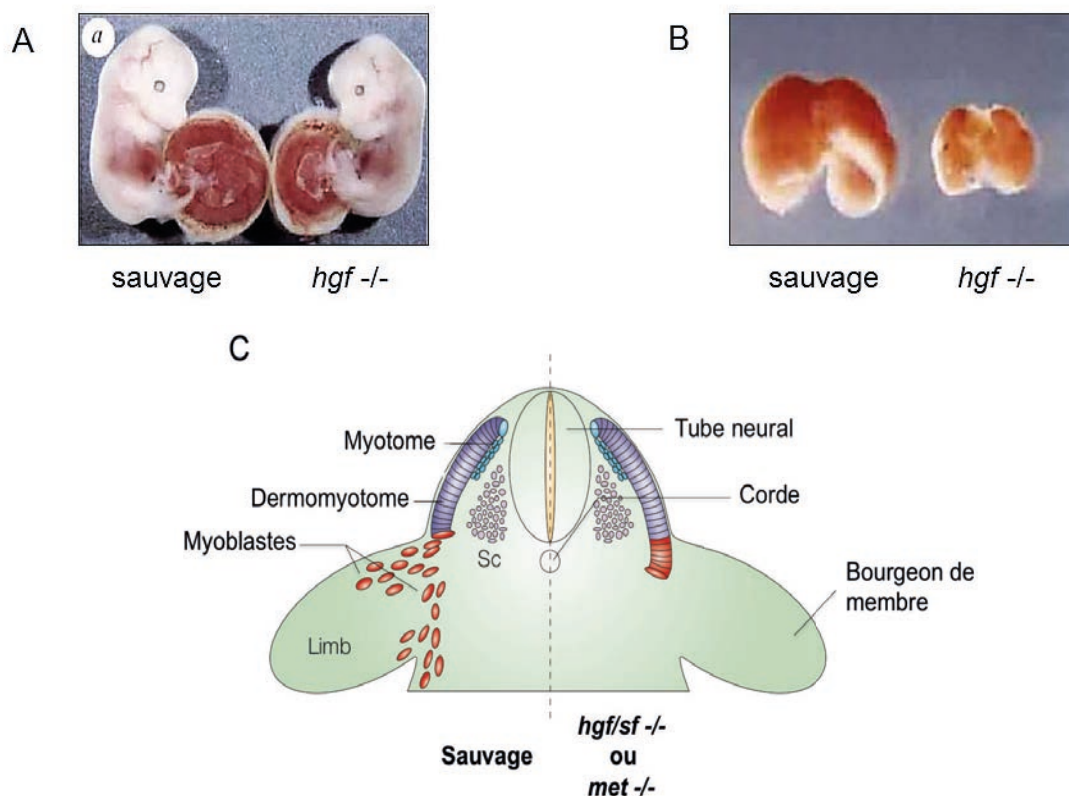


Figure 10 - A - Embryons de souris sauvages et *hgf/sf-/-* à J13,5 (tiré de (Uehara et al 1995)). B - Foies d'embryons de souris sauvages et *hgf/sf-/-* à J14,5 (tiré de (Schmidt et al 1995)). C - Schéma de la migration des myoblastes vers les bourgeons des membres (tiré de (Birchmeier et al 2003). Sc : sclérotome. Limb : membre.

A/B - Des souris *hgf/sf-/-* meurent après 15 jours de développement et présentent un défaut d'organisation du trophoblaste labyrinthique du placenta ainsi qu'un foie réduit.

C - Par ailleurs, durant un développement normal, les précurseurs myogéniques migrent vers les bourgeons de membres où ils se différencient en myoblastes (à gauche). Dans le cas d'embryons *met-/-* ou *hgf/sf-/-* (à droite), les progéniteurs restent dans le dermomyotome.

Plus tardivement, dans les années 2000, l'implication du couple HGF/SF-MET a été démontrée dans la mise en place d'organes. Par exemple, l'extinction de MET par l'utilisation de KO conditionnels dans les précurseurs des muscles squelettiques a permis de mettre en évidence son rôle dans la mise en place de certains muscles faciaux (Prunotto et al 2004). Par ailleurs, son invalidation dans les poumons inhibe significativement le développement alvéolaire (Calvi et al 2013). Quant à son KO conditionnel dans les reins, il permet de démontrer son implication dans la régulation des branchements des bourgeons urétéraux, structures menant au bon développement des néphrons. A noter qu'une augmentation de l'expression de l'EGFR a été observée

suggérant un mécanisme compensatoire de la perte de MET par l'activation de l'EGFR et soulignant l'importance de la collaboration de ces deux récepteurs dans l'organogenèse (Ishibe et al 2009).

De plus, le couple HGF/SF-MET est important dans le développement du système nerveux. Cette importance a été démontrée notamment en utilisant des *knock in* de MET, dans lesquelles la forme sauvage du récepteur est remplacée par une forme mutée. Ainsi, une étude utilisant des KI de MET dépourvus d'activité kinase a démontré un rôle du couple HGF/SF-MET dans l'innervation sensorielle de la peau des membres et du thorax. Par ailleurs, cette étude a également démontré *in vitro* le rôle de l'HGF/SF dans la croissance axonale et la survie des neurones sensorielles périphériques en coopération avec le NGF (*Nerve Growth Factor*) (Maina et al 1997). De plus, l'extinction conditionnelle de MET dans le système nerveux central pendant le développement embryonnaire démontre son implication dans la survie d'un groupe de motoneurones innervant le muscle du petit pectoral (Lamballe et al 2011). Au cours du développement du cerveau, l'invalidation de MET dans la zone sous-corticale a mené à une augmentation du nombre des interneurons striataux GABA-ergiques. Alors que les fonctions motrices semblent intactes, les procédures d'apprentissage sont retardées, suggérant l'existence d'un lien entre MET et certains troubles neurologiques avec des défauts d'apprentissage comme l'autisme (Martins et al 2011). Ceci serait en cohérence avec d'autres études qui ont montré une association entre l'autisme et la présence de mutations de *met* ainsi qu'une dérégulation de son expression dans certaines zones du cerveau (Campbell et al 2006, Peng et al 2013).

C.2. Implication du couple HGF/SF-MET chez l'adulte :

Le couple HGF/SF-MET est principalement impliqué dans la régénération tissulaire chez l'adulte. En effet, un KO conditionnel inductible de MET dans le foie de souris adultes a mené à une régénération moins efficace et une inflammation chronique au niveau des zones du foie lésées ou ayant subi une hépatectomie (figure 11A) (Huh et al 2004). De plus, un relargage massif et rapide de l'HGF/SF a été observé suite à des lésions ou des ablations de certains organes. Ainsi, une augmentation du taux d'HGF/SF a été observée suite à des blessures cutanées (Chmielowiec et al 2007), des lésions

rénales (Kawaida et al 1994, Mizuno et al 2008, Rabkin et al 2001), pulmonaires (Ohmichi et al 1996), de la moelle épinière (Shimamura et al 2007) mais également suite à un infarctus du myocarde (Christensen et al 2003, Jin et al 2003, Nakamura et al 2000). Il a d'ailleurs été démontré que des injections d'HGF/SF permettaient l'amélioration de la régénération de ces nombreux organes (Jin et al 2003, Kawaida et al 1994, Mizuno et al 2008, Nakamura et al 2000, Ohmichi et al 1996) et donnent lieu à un espoir dans le traitement de la cirrhose hépatique (Mizuno and Nakamura 2007).

Ainsi, dans de nombreuses conditions, l'HGF/SF peut être utilisé pour favoriser la régénération tissulaire. C'est dans ce contexte que l'équipe CBC tente de mettre au point des agonistes de MET en synthétisant chimiquement des sous domaines de l'HGF/SF dont les sous domaines N et K1 (figure 11B) (Ollivier et al 2012, Raibaut et al 2013). Ainsi, comme décrit précédemment, l'équipe a démontré que le domaine K1 présenté sous forme dimérisée était suffisant pour activer le récepteur MET et protéger le foie d'une hépatite fulminante. De ce fait, des travaux sur l'utilisation du domaine K1 dimérisé dans la régénération tissulaire sont en cours. En effet, cet agoniste serait une alternative intéressante à celle de l'HGF/SF dont le gros poids moléculaire ainsi que sa liaison aux héparanes sulfates pourraient diminuer sa biodisponibilité et rendre son utilisation difficile, contrairement à celle du K1 dont le poids moléculaire est bas et dont l'action est indépendante des héparanes sulfates.

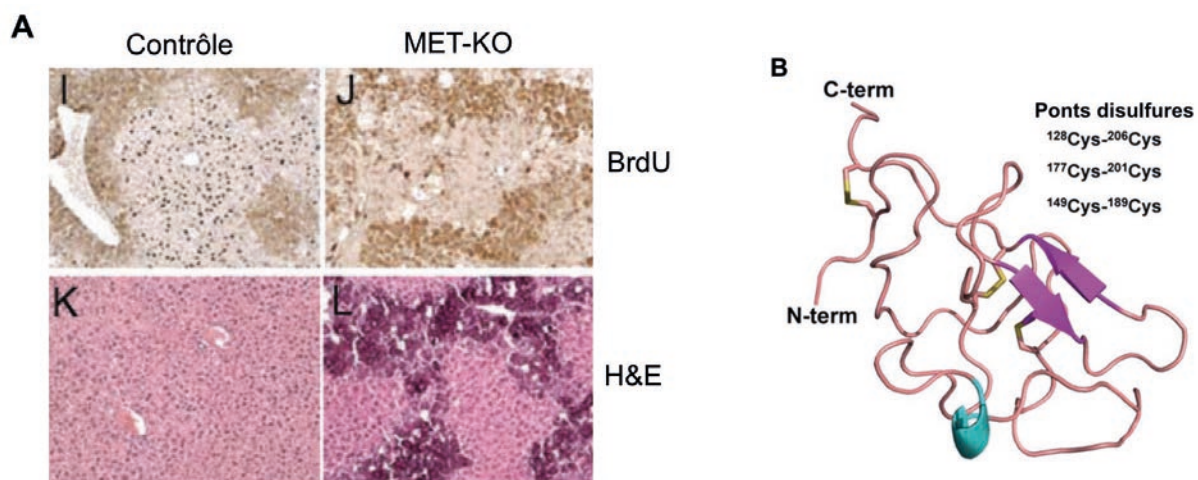


Figure 11 - A - Les souris MET KO présentent une régénération du foie moins efficace. Tiré de (Huh et al 2004). B - Structure du domaine K1 de l'HGF/SF. Tiré de (Simonneau et al 2015).

A- Les marquages au BrdU (contre-marquage hématoxyline) et à l'hématoxyline éosine montrent une régénération moins efficace avec des lésions persistantes dans les souris MET KO suite à un traitement par du CCl₄ (hépatotoxique) montrant l'importance de la signalisation HGF/SF-MET dans la régénération tissulaire.

B- A cet effet, l'équipe CBC a synthétisé le domaine K1 de l'HGF/SF dans le but de l'utiliser dans des essais de régénération tissulaire.

C.3. Réponse induite en culture cellulaire :

La diversité et la complexité des voies de signalisation activées suite à la fixation de l'HGF/SF sur MET fait de ce dernier un récepteur impliqué dans de nombreuses réponses biologiques à partir de lignées cellulaires en culture.

C'est ainsi qu'en 1984, année de sa découverte, Nakamura et ses collaborateurs ont démontré une augmentation de la prolifération des hépatocytes en utilisant de l'HGF. Cette observation a été plus tard généralisée aux cellules épithéliales. L'HGF/SF a également été découvert grâce à ses capacités à induire la dispersion cellulaire. En effet, comme son nom l'indique également, le SF permet la dispersion des cellules épithéliales qui perdent leur adhésion, se dissocient et s'éloignent les unes des autres (figure 12) (Maulik et al 2002, Stoker et al 1987). Il a également été démontré que l'HGF/SF induit la motilité des cellules épithéliales, leur migration et leur invasion, c'est-à-dire leur capacité à progresser à travers une couche de collagène ou de constituants de la matrice extracellulaire (Maulik et al 2002, Stoker et al 1987). Par ailleurs, une réponse plus

complexe est également induite. En effet, lors de la culture de ces cellules épithéliales dans une matrice tridimensionnelle mimant la matrice extracellulaire, celles-ci s'organisent spontanément sous forme d'amas compacts. L'ajout de l'HGF/SF permet à ces cellules de former des réseaux de branchement imitant les réseaux des tissus d'origine comme par exemple celui des tubulures rénales ou des glandes mammaires. Cette réponse est connue sous le nom de morphogenèse de branchement (figure 12) (Brinkmann et al 1995, Montesano et al 1991, Rosario and Birchmeier 2003).

L'HGF/SF est également impliqué dans l'angiogenèse. En effet, il favorise la survie, la prolifération, la migration et l'invasion des cellules endothéliales. Des études ont démontré que l'HGF/SF favorise l'expression par les cellules endothéliales de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF et augmente l'expression du VEGFR2 dans les cellules HUVEC en synergie avec le VEGF. Le rôle de l'HGF/SF dans l'angiogenèse a également été démontré *in vivo*. En effet, Grant et ses collaborateurs ont montré que des quantités physiologiques de l'HGF/SF induisaient l'angiogenèse *in vivo*. Cette activité angiogénique est inhibée par des anticorps spécifiques dirigés contre l'HGF/SF (Grant et al 1993). De plus, l'HGF/SF favorise la dégradation de la matrice extracellulaire favorisant ainsi la migration et l'invasion des cellules endothéliales. Cet effet est induit, du moins en partie, par l'induction de l'expression de métalloprotéases par les cellules endothéliales vasculaires. Ainsi, l'HGF/SF favorise la synthèse de la MT1-MMP et induit l'activation de la MMP2 dans les cellules endothéliales microvasculaires dermiques HDMEC (*Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*) et les cellules endothéliales de l'artère coronaire HCAEC (*Human Coronary Arterial Endothelial Cells*) (Abounader and Laterra 2005, Bussolino et al 1992, Esposito et al 2005, Sulpice et al 2009).

De ce fait, l'HGF/SF est un facteur pro-angiogénique soit de manière directe en induisant l'expression de MMP ou de manière indirecte en favorisant l'expression de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF.

Il est par ailleurs intéressant de noter qu'une interaction entre l'HGF/SF et MET d'une part et le VEGF et VEGFR2 d'autre part, a été décrite dans un contexte différent de celui de l'angiogenèse. En effet, une étude a montré, dans des modèles murins de glioblastomes, que suite à une interaction directe entre MET et le VEGFR2, l'ajout du VEGF régule négativement la signalisation HGF/SF-MET. En effet, cette stimulation

induit un recrutement accru de la phosphatase PTP1B au complexe MET/VEGFR2 qui mène à une baisse de la phosphorylation de MET, lorsqu'il est stimulé par l'HGF/SF, induisant ainsi une baisse de l'invasion tumorale (Lu et al 2012).

La signalisation HGF/SF-MET permet également d'induire des réponses de survie et de protection contre l'apoptose. En effet, il a été démontré dans différents types cellulaires que le couple HGF/SF-MET induit la survie suite à des stress divers comme des traitements par des inducteurs d'apoptose (figure 12) (Longati et al 1996, Yo et al 1998). En effet, suite à l'activation de MET par l'HGF/SF, le récepteur active la voie de signalisation PI3K/AKT initiée par le recrutement direct de la PI3K et responsable des réponses de survie. Par ailleurs, et comme décrit précédemment, le couple HGF/SF-MET inhibe la mort cellulaire induite par FAS. En effet, en se liant à FAS, MET empêche la fixation du ligand FAS-L et prévient ainsi l'apoptose.

Paradoxalement, il a été suggéré que ce couple HGF/SF-MET aurait également des propriétés pro-apoptotiques physiologiques. En effet, il a été mis en évidence que l'HGF/SF est impliqué dans l'inhibition de certaines fibroses. Cet effet serait obtenu par l'induction par l'HGF/SF de la mort des fibroblastes pulmonaires et hépatiques responsable de la sécrétion de l'exsudat menant à ces fibroses (Kim et al 2005, Matteucci et al 2001, Tulasne and Foveau 2008).

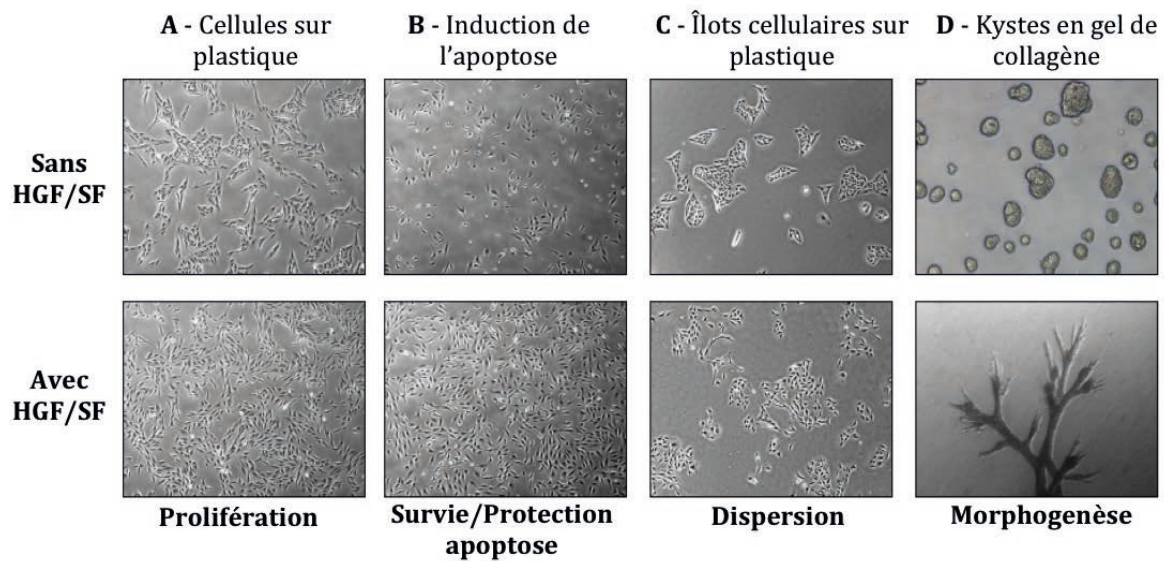


Figure 12 – Principales réponses biologiques du couple HG/SF-MET sur des cellules épithéliales (MDCK) en culture.

A- réponse de prolifération sur plastique : Les cellules sont cultivées sur plastique, l'ajout de l'HGF/SF permet de stimuler leur prolifération. B- réponse de survie sur plastique suite à une induction de l'apoptose : les cellules sont cultivées sur plastique puis traitées par un inducteur de l'apoptose (10 μ M d'anisomycine). L'ajout de l'HGF/SF permet de protéger ces cellules contre l'apoptose. C- réponse de dispersion sur plastique : les cellules sont cultivées en petits îlots sur plastique. L'ajout de l'HGF/SF permet leur dissociation et leur éloignement les unes des autres. D- réponse de morphogenèse en gel de collagène : les cellules sontensemencées dans des substituts de matrice extracellulaire (ici le collagène). L'ajout de l'HGF/SF permet la formation de réseaux de branchement imitant les structures de leurs tissus d'origine.

D. MET, l'HGF/SF et la matrice extracellulaire :

Comme indiqué précédemment MET interagit avec de nombreux partenaires extracellulaires comme les HSPG et les intégrines. La signalisation HGF/SF-MET est également impliquée dans le remaniement de la matrice extracellulaire *via* l'induction de l'expression et l'activation de certaines MMP, favorisant ainsi la migration et l'invasion des cellules endothéliales.

D.1. La matrice extracellulaire :

La matrice extracellulaire (MEC) est un mélange hétérogène de protéines et de polysaccharides qui soutiennent les cellules, leur offrant ainsi un support physique nécessaire à leur organisation en tissus et/ou organes. Cette matrice a longtemps été

perçue comme un support inerte fournissant simplement une charpente structurale. Elle joue, en réalité, un rôle actif dans l'organisation des réponses cellulaires lors des adaptations physiologiques et pathologiques. En effet, il existe une interaction active entre les cellules et la matrice extracellulaire. La matrice entoure les cellules qui la synthétisent et en retour elle détermine leur phénotype. Ce réseau extracellulaire de protéines, glycoprotéines et protéoglycanes fournit aux cellules adhérentes un support d'accroche et des signaux biochimiques qui régulent le devenir de la cellule et sa fonction (figure 13). Par exemple, le Matrigel™ (matrice extracellulaire tridimensionnelle mimant la membrane basale) est indispensable au maintien de la prolifération, différenciation et survie de certaines cellules *in vitro* car elle restaure les caractéristiques cellulaires retrouvées *in vivo*. Ce système est aussi très largement utilisé pour étudier l'invasion des cellules tumorales et la germination vasculaire (Folkman et al 1988).

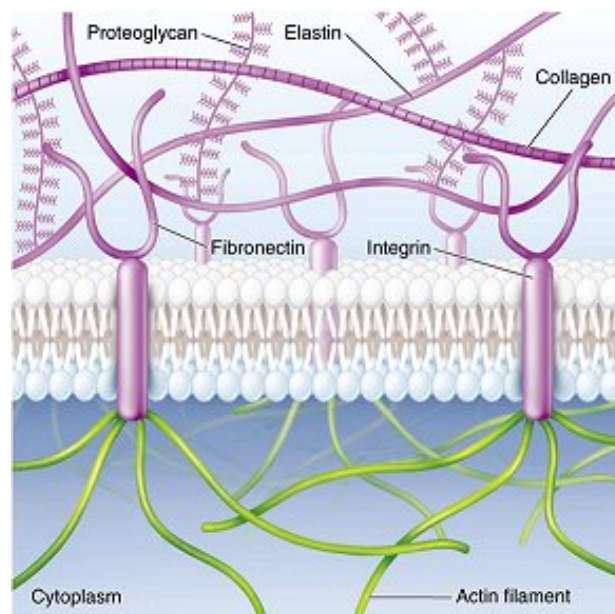


Figure 13 – Aperçu général de l'organisation de la matrice extracellulaire.

Les protéines : fibronectine, collagène et laminine. Les protéoglycanes sont de larges complexes polysaccharidiques qui occupent une grande partie du volume de l'espace extracellulaire

Parmi les composants les plus importants de la MEC se trouvent notamment le collagène, l'acide hyaluronique et les héparanes sulfates (HS). Ces derniers sont des glycosaminoglycanes (GAG) complexes et sulfatés. Ils sont parfois branchés sur des protéines spécifiques, formant des protéoglycanes (HSPG). Des unités disaccharidiques répétées de N-acétylglucosamine et d'acide glucuronique et/ou iduronique caractérisent

ces HS (figure 14). Ces disaccharides sulfatés fournissent une variété de sites d'amarrage pour une multitude de protéines ligands (enzymes, cytokines, facteurs de croissance (comme le HGF/SF), inhibiteurs de protéases, protéines de la matrice extracellulaire) (Esko and Selleck 2002). Les HS interviennent donc dans le stockage de ces ligands et/ou dans la rétention des polypeptides au niveau de la MEC à la surface cellulaire, jouant le rôle de réservoirs inactifs. Le clivage des HS libère ces facteurs qui sont convertis en médiateurs bioactifs, assurant ainsi une réponse tissulaire rapide aux signaux locaux ou systémiques. De ce fait, ils facilitent souvent l'activité biologique des ligands en participant activement à la formation des complexes avec leurs récepteurs. Notamment, leurs interactions avec l'HGF/SF (ou ses variants) et le récepteur MET participent à la régulation et au bon fonctionnement de la signalisation HGF/SF-MET. Les HS jouent de ce fait un rôle biologique critique dans l'angiogenèse, l'inflammation, la morphogénèse, la réparation tissulaire ou la métastase tumorale (Masola et al 2014, Vlodavsky et al 1991).

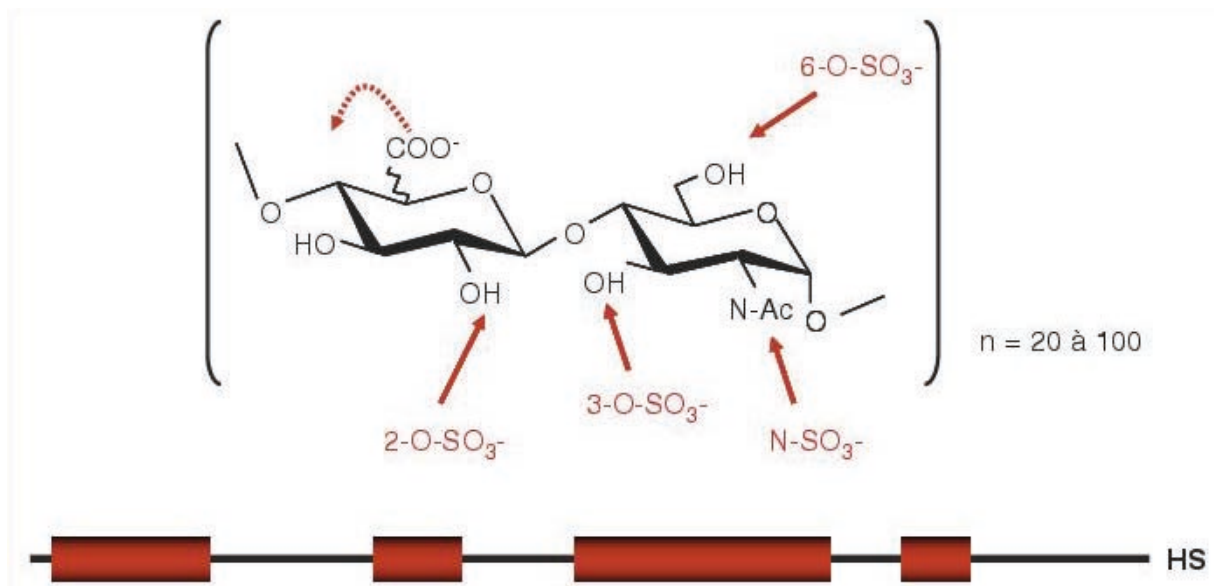


Figure 14 – Structure des glycosaminoglycanes de type héparane sulfate (Lortat-Jacob et al 2005)

L'unité de répétition des héparanes sulfates (HS) est un disaccharide où la glucosamine peut être N-acétylée ou N-sulfatée, plus rarement non substituée, où l'acide uronique peut être l'acide glucuronique ou son épimère en C5 l'acide iduronique (flèche rouge en pointillée), les hydroxyles en C3 et C6 de la glucosamine et en C2 de l'acide uronique peuvent être sulfatés.

Ces modifications sont concentrées en de courts domaines (en rouge) qui constituent ainsi des sites d'interactions pour de nombreuses protéines.

Malgré une connaissance détaillée des voies de biosynthèse des HS (Vlodavsky et al 2012), leur mode de dégradation est moins bien caractérisé. Des études ont démontré que l'héparanase, enzyme impliquée dans la dégradation de l'héparine en des fragments physiologiquement actifs, était également capable de cliver les HS et libérer les chaînes polysaccharidiques (Masola et al 2014). La dégradation et la modulation de la structure des HS mènent à un profond remaniement de la MEC. Néanmoins, et de manière étonnante, les travaux sur le rôle de l'héparanase restent assez limités en comparaison avec d'autres enzymes responsables de la dégradation de la MEC (comme les MMP par exemple).

D.2. L'héparanase :

D.2.1. Structure de l'héparanase :

L'héparanase est une endo- β -glucuronidase qui clive spécifiquement les chaînes latérales des HS vraisemblablement à des sites de basse sulfatation, libérant des produits saccharidiques de 4 à 7 kDa. Les cellules de mammifères expriment une seule enzyme fonctionnelle (héparanase-1) (Vlodavsky et al 2012). Une seconde héparanase (héparanase-2) a été clonée et séquencée mais ne possède pas, à ce jour, d'activité connue de dégradation des HS (Levy-Adam et al 2010). Je ferai, dans ce travail, uniquement référence à l'héparanase-1.

L'ARNm de l'héparanase code une protéine de 61.2 kDa composée de 543 acides aminés. Cette pro-enzyme est clivée de manière post-traductionnelle dans le lysosome en deux sous unités de 8 et 50 kDa, associées de manière non covalente et formant un hétérodimère nécessaire à l'activité enzymatique. Ce clivage, qui implique la perte d'un segment de liaison de 6 kDa, est réalisé par la Cathepsine L. La structure de l'héparanase active est semblable à celle d'un tonneau (*TIM barrel fold*) regroupant le site actif de l'enzyme et la région C-terminale (Abboud-Jarrous et al 2008, Levy-Adam et al 2003).

D.2.2. Fonctions de l'héparanase :

Physiologiquement, l'héparanase est exprimée principalement par les plaquettes, mastocytes, trophoblastes placentaires, kératinocytes, et leucocytes. La fonction biochimique principale de l'héparanase est de catalyser la dégradation des HS, mais à travers celle-ci, elle régule de nombreux processus physiologiques et pathologiques de grande importance. En effet, elle est impliquée dans des phénomènes fondamentaux de biologie surtout à travers la libération des facteurs de croissance liés aux HS (comme le FGF, HGF/SF et VEGF) résidant dans la MEC (Elkin et al 2001). Cette enzyme joue également un rôle déterminant dans de nombreuses pathologies comme la progression et la métastase tumorales. Elle est également impliquée dans la pathogenèse de la néphropathie diabétique, dégradant les HS au niveau des membranes basales glomérulaires et menant à une protéinurie et à une dysfonction rénale. Tout ceci fait de l'héparanase une cible thérapeutique prometteuse. En effet, des oligosaccharides inhibant son activité enzymatique sont actuellement développés et évalués dans des essais cliniques (Vlodavsky et al 2012).

D.2.3. Mécanismes de régulation de l'héparanase :

Parmi les mécanismes pouvant intervenir dans la régulation de l'activité de l'héparanase, le pH du microenvironnement cellulaire semble être un paramètre critique. Plusieurs études ont rapporté que cette enzyme montrait une activité endoglycosidase en dessous d'un pH de 6.8 avec une activité optimale à un pH entre 5.0 et 6.0, en cohérence avec son activité lysosomiale, et aucune activité enzymatique mesurable au pH physiologique de 7. Ceci suggère que cette molécule à profil pH-dépendant est également régulée par le microenvironnement extracellulaire. Une fois au niveau de la surface cellulaire, à un pH physiologique, elle fonctionnerait comme une molécule d'adhésion cellulaire alors que dans des conditions de pH plus acides, existantes généralement dans l'environnement direct des tumeurs et des sites inflammatoires, elle exercerait son activité endoglycosidique sur les HS (Nardella et al 2004).

D.2.4. L'héparanase dans le cancer :

Plusieurs liens ont été établis entre la surexpression de l'héparanase et le cancer. En effet, des études décrivant la surexpression et l'extinction du gène de l'héparanase indiquent que l'héparanase ne favorise pas seulement la dissémination et la métastase cellulaires, mais promeut également l'établissement d'un réseau vasculaire qui accélère la croissance tumorale primitive et fournit une porte de sortie pour les cellules métastatiques. Ces études démontrent ainsi les capacités pro-métastatiques et pro-angiogéniques de l'héparanase (Cohen et al 2006). Enfin, les analyses d'immunohistochimie, d'hybridation *in situ*, de RT-PCR et de PCR en temps réel révèlent que l'héparanase est surexprimée dans tous les types majeurs de cancers humains (carcinomes, sarcomes et hémopathies malignes). Ces niveaux élevés de l'enzyme sont souvent associés avec des réductions de survie post-opératoire et une augmentation des métastases tumorales. L'ensemble de ces observations cliniques soutiennent l'implication de l'héparanase dans la progression tumorale et encouragent le développement de ses inhibiteurs comme thérapeutiques anti-cancéreuses (Ilan et al 2006).

E. Implication du couple HGF/SF-MET dans les cancers.

Malgré une régulation fine de la signalisation HGF/SF-MET, sa dérégulation a été associée à la tumorigenèse et l'acquisition de phénotypes invasifs dans de nombreux types de cancers. La dérégulation de MET repose essentiellement sur sa surexpression, sur sa suractivation suite à des mutations activatrices (germinales ou somatiques) ou sur une hypersécrétion du ligand HGF/SF par boucle autocrine ou paracrine (Schmidt et al 1999, Tokunou et al 2001).

E.1. Les mutations du récepteur MET :

Des mutations activatrices de la kinase de MET ont été retrouvées dans le cadre des carcinomes papillaires rénaux héréditaires établissant un lien direct entre MET et le cancer (Gherardi et al 2012, Jeffers et al 1997, Schmidt et al 1997). Par la suite, d'autres mutations se sont additionnées et on en dénombre actuellement plus de 200

répertoriées sur le site COSMIC (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*) (figure 15). La plupart de ces mutations sont des mutations faux-sens (73,6%) ou silencieuses (16,1%) et se répartissent sur toute la séquence de *met*. Néanmoins certains 'hot spots' ont été décrits. En effet, la plupart de ces mutations se trouvent au niveau du domaine kinase de MET et certaines ont été découvertes dans la partie extracellulaire et le domaine juxtamembranaire. Des mutations ont également été trouvées, dans une moindre mesure, dans la partie C-terminale.

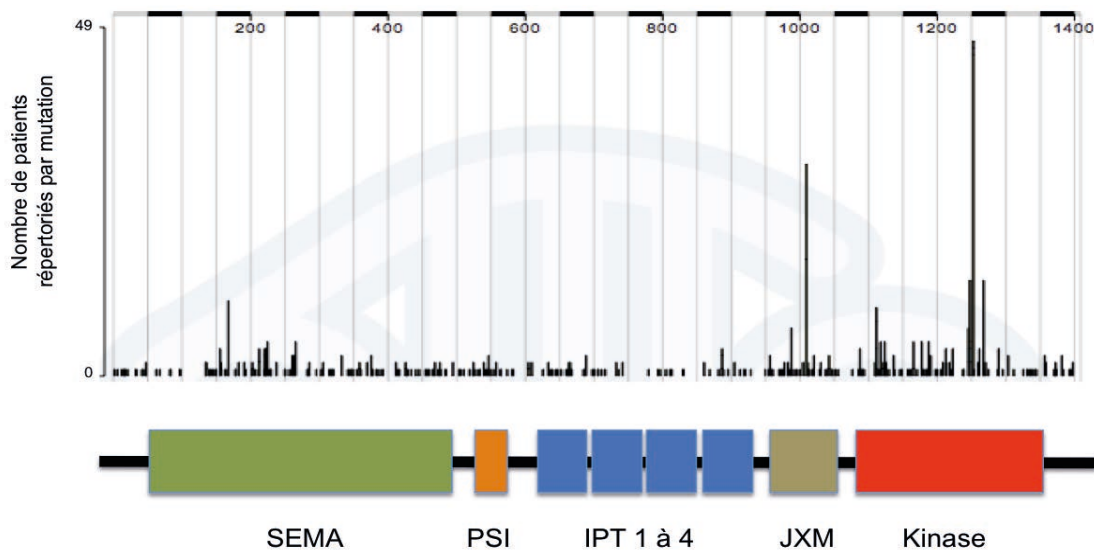


Figure 15 – Mutations de MET identifiées et répertoriées chez l'Homme.

<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=MET#histo>

Les mutations sont réparties sur toute la séquence avec trois 'hot spots' : au niveau du domaine extracellulaire (principalement au niveau du domaine SEMA), au niveau du domaine juxtamembranaire et au niveau du domaine kinase.

E.1.1. Mutations du domaine extracellulaire :

Ces mutations ont été détectées initialement dans des cohortes de cancer du poumon et sont principalement retrouvées au niveau du domaine SEMA (Jagadeeswaran et al 2006, Ma et al 2003, Ma et al 2008). Leurs conséquences fonctionnelles ne sont pas très bien définies pour l'instant et leurs réelles implications dans les cancers sont controversées. En effet, la mutation la plus fréquente, la mutation N375S, est en fait une mutation germinale. Il a été démontré que la présence de cette mutation n'est pas associée à un plus grand risque de cancer gastrique et pulmonaire et est même corrélée

significativement avec une baisse du risque de cancer gastrique dans une étude effectuée dans la population chinoise. De plus, il a été proposé que ces mutations diminuent l'affinité de MET pour son ligand (Liu et al 2012, Shieh et al 2013). Ainsi, ces mutations extracellulaires semblent être des polymorphismes dont le rôle dans la tumorigénèse n'a pas encore été établi.

E.1.2. Mutations du domaine juxtamembranaire :

Différentes mutations ont été décrites au niveau du domaine juxtamembranaire, notamment des mutations induisant une délétion de l'exon 14 codant 47AA du domaine juxtamembranaire de MET. Cette délétion a été décrite pour la première fois en 2006 chez des patients atteints de cancers pulmonaires non à petites cellules (NSCLC) et est la conséquence de mutations variées (délétions et mutations ponctuelles) touchant les sites donneurs et accepteurs d'épissage autour de l'intron 14 (Kong-Beltran et al 2006). De vastes cohortes de patients atteints de cancers du poumon et l'analyse de leur ADN génomique ou de leur ARNm par les techniques de séquençage haut débit ont permis de confirmer l'existence de ces mutations (Cancer Genome Atlas Research Network 2014, Kong-Beltran et al 2006, Seo et al 2012). Très récemment, l'analyse des profils génomiques des tumeurs de 38 028 patients ont identifié 221 cas avec une délétion de l'exon 14 tous cancers confondus (0.6%) dont 126 cas d'adénocarcinomes pulmonaires, portant le taux de patients portant ces mutations exon 14 à 3% pour ce cancer (Frampton et al 2015). Par ailleurs, il a très récemment été montré que les mutations conduisant à la délétion de l'exon 14 sont également présentes dans les cancers gastriques et du côlon avec 5% de fréquence ainsi que dans les neuroblastomes, suggérant l'existence d'un mécanisme commun de dérégulation de MET dans ces cancers (Asaoka et al 2010, Hu et al 2013, Lee et al 2015). Comme je l'ai décrit précédemment, le domaine juxtamembranaire de MET porte plusieurs mécanismes de régulations négatives du récepteur. Ainsi, la forme de MET produite suite à une délétion de l'exon 14 est dépourvue de la Y1003 responsable du recrutement de l'E3 ubiquitine ligase c-CBL. Le récepteur présente donc un défaut d'internalisation en réponse à l'HGF/SF et donc une signalisation plus soutenue (Abella et al 2005, Asaoka et al 2010, Kong-Beltran et al 2006, Ma et al 2005, Onozato et al 2009, Peschard et al 2001). Il est à noter que le domaine délété porte également le site de clivage des caspases ainsi que la

sérine 985 qui sont également des mécanismes de régulation négative. Néanmoins, la conséquence de leur perte sur l'activation des réponses induites par MET et l'induction de la tumorigénèse n'est pas encore connue (figure 16).

La délétion de l'exon 14 est au centre d'investigations intenses. En effet, il s'agit de la première situation dans laquelle on observe en clinique une dérégulation du récepteur MET suite à des mutations dans une proportion relativement importante de patients en échec thérapeutique. Ceci constitue donc une avancée très importante particulièrement du fait de l'association de cette délétion avec une sensibilité plus élevée aux traitements ciblant MET (voir paragraphe F.4 page 82).

Par ailleurs, d'autres mutations ont été décrites au niveau du domaine juxtamembranaire comme les mutations ponctuelles N930S, R970C, P991S et T992I (figure 14) (Jagadeeswaran et al 2006, Ma et al 2003, Ma et al 2008). Ces mutations, dont le mécanisme reste inconnu, sont de fréquence assez faible et n'ont pas d'effets directs sur l'activité kinase du récepteur suggérant qu'elles sont des polymorphismes de MET (Tyner et al 2010). Récemment, l'équipe SIGNAL (Signalisation, apoptose et cancer) de l'UMR8161 a démontré, dans des lignées issues du cancer du poumon, que la mutation R970C induisait la génération d'un fragment de MET d'environ 45kDa (appelé p45 MET) suite à un clivage par les calpaïnes. Ce fragment, à localisation nucléaire, semble être impliqué dans les capacités migratoires des cellules.

E.1.3. Mutations retrouvées au niveau du domaine kinase :

Concernant les mutations localisées dans le domaine kinase, elles ont d'abord et principalement été détectées dans les cancers papillaires rénaux (mutations germinales et somatiques) et dans les cancers des voies aérodigestives supérieures (mutations somatiques) (Di Renzo et al 2000, Jeffers et al 1998, Schmidt et al 1997). Les conséquences de ces mutations ont été identifiées pour certaines d'entre elles. Par exemple la mutation D1228H sensibilise le récepteur à la stimulation par l'HGF/SF (Chiara et al 2003). D'autres, comme la mutation Y1235D, induit une phosphorylation et une activation constitutive du récepteur sans ligand. Cette mutation a été détectée dans le cancer des voies aérodigestives supérieures et consiste au remplacement de la

tyrosine (phosphorylée quand le récepteur est activé, voir paragraphe A.5.2 page 26) par un acide aspartique mimant ainsi une phospho-tyrosine. Ceci mène à une activité kinase constitutive du récepteur qui n'est même plus dépendante de la phosphorylation des tyrosines Y1234 et 1235. Cette activation est néanmoins plus faible que celle d'un récepteur pleinement activé et phosphorylé sur ses deux tyrosines indiquant que cette mutation ne peut pas entièrement compenser l'absence de phosphorylation de la Y1234 (Cristiani et al 2005).

D'autres mutations, comme la D1246N et M1268T, activent le récepteur ou son activité kinase sans phosphoryler les tyrosines Y1234 et Y1235. Ces résultats indiquent que ces mutations activatrices stabilisent le récepteur dans sa conformation active par un mécanisme indépendant de l'autophosphorylation des tyrosines 1234 et 1235. Ceci suggère que la signalisation d'un MET sauvage et d'un MET muté pourrait s'effectuer par des mécanismes différents (Jeffers et al 1997, Jeffers and Vande Woude 1999). Par ailleurs, ces mutations induisent un recyclage plus important et une diminution de la dégradation du récepteur qui s'accumule alors dans les endosomes (Joffre et al 2011).

De manière intéressante, des études ont démontré que l'expression dans des souris *knock in* de formes mutantes de MET, comme la mutation M1268T, provoque le développement de cancers mammaires avec des profils différents accompagnés d'une augmentation du nombre de copies de MET. Ces études suggèrent que MET pourrait servir comme cible thérapeutique pour les patients avec ce genre de tumeurs agressives et sans alternatives de traitement (Graveel et al 2004, Graveel et al 2009, Ponzio et al 2009).

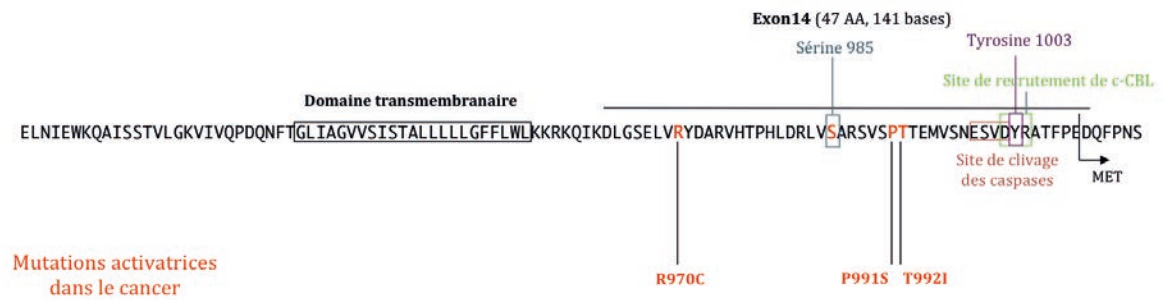


Figure 16 – Principales mutations et mécanismes de régulation du domaine juxtamembranaire de MET codé par l'exon 14.

Le domaine codé par l'exon 14 ainsi que les mutations R970C, T991S, T992I du domaine juxtamembranaire sont représentées dans cette figure. Les principaux sites de régulation du récepteur MET contenus dans le domaine juxtamembranaire et codée par l'exon 14 sont également représentés : la sérine 985 qui quand elle est phosphorylée induit une inhibition de l'activité kinase du récepteur MET, la tyrosine Y1003 responsable du recrutement de l'ubiquitine ligase c-CBL ainsi que le site de clivage par les caspases.

E.2. La surexpression du récepteur :

Les mutations, même si leur caractère transformant est établi, ne concernent qu'une proportion assez restreinte de patients. En revanche, la surexpression du récepteur, en fonction de l'étude et de l'organe étudié touche une plus grande proportion de patients (figure 17). Ainsi, cette surexpression est observée dans 20 à 70 % des cancers du sein (Garcia et al 2007, Ghoussoub et al 1998, Scagliotti et al 2013), plus de 60 % des cancers pulmonaires non à petites cellules (Ma et al 2005), 40 à 70 % des cancers gastriques (Teng and Lu 2013) et jusqu'à 80 % des carcinomes rénaux (Natali et al 1996). Il est à noter qu'il n'est pas clair si la surexpression de MET observée dans les tumeurs est réellement associée à son activation. Cependant, cette surexpression a été associée à un mauvais pronostic notamment dans les carcinomes mammaires et les cancers gastriques (Garcia et al 2007, Ghoussoub et al 1998, Peng et al 2014). Il a également été montré que des souris surexprimant MET développaient des tumeurs mammaires (Ponzo et al 2009) ainsi que des carcinomes hépatocellulaires (Wang et al 2001).

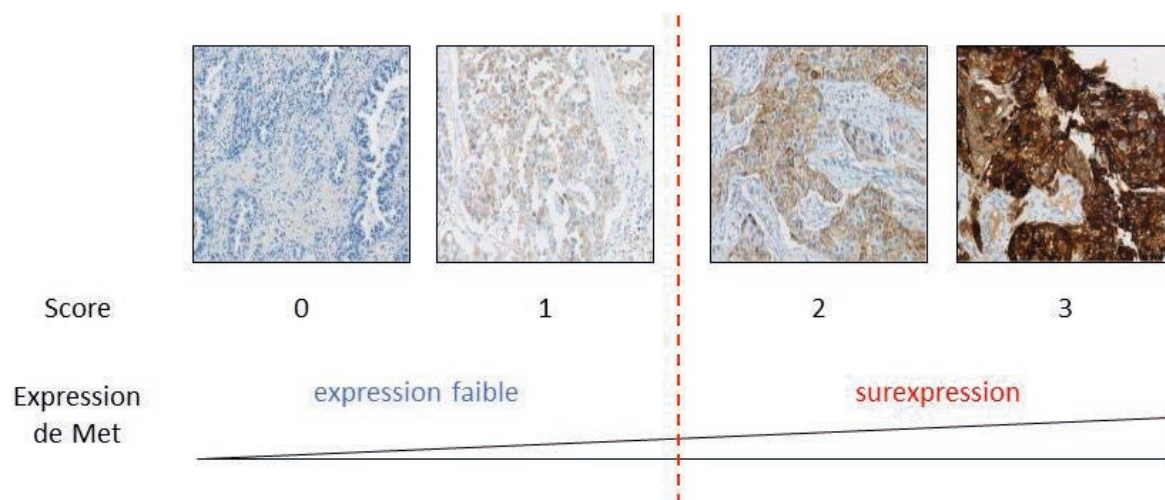


Figure 17 – Expression du récepteur MET dans les cancers pulmonaires.

L'expression de MET, détectée par IHC (*ImmunoHistoChemistry*) montre des niveaux d'expression différents. Un score est attribué à chaque « niveau d'intensité » pour chaque échantillon. Le niveau d'intensité est déterminé en fonction de l'intensité du marquage ainsi que le pourcentage de cellules marquées. Le score 0 correspond à une absence de marquage ou un marquage de n'importe quelle intensité de moins de 50% de la tumeur. Le score 1 correspond à une intensité faible d'au moins 50% de la tumeur et une intensité modérée de moins de 50% de la tumeur. Le score 2 correspond à une intensité modérée d'au moins 50% de la tumeur et une intensité forte de moins de 50% de la tumeur. Le score 3 correspond à une intensité de marquage très forte d'au moins 50% de la tumeur (les scores sont établis d'après (Spigel et al 2013)). Résultats obtenus par l'équipe SIGNAL (Montagne et al 2015).

La surexpression du récepteur MET peut être due à différents mécanismes. Elle peut se produire suite à la fixation du facteur de transcription ETS1 sur le promoteur de *met* induisant sa transcription. Cette surexpression a également été observée suite à l'introduction du gène *ras* dans des thyrocytes humains normaux en culture primaire ainsi qu'avec l'utilisation de cellules issues de la thyroïde et contenant un gène *ras* muté inductible au zinc (Gambarotta et al 1996, Ivan et al 1997).

Par ailleurs, certains mi-RNA, petits brins d'ARN non codant capables de se lier à leur ARNm cibles et d'inhiber leur traduction, sont également impliqués dans la régulation de MET. Ainsi, il a été démontré que l'inhibition de certains mi-RNA induit à la surexpression du récepteur. Parmi ces mi-RNA se trouvent le miR-34b (Migliore et al 2008), ainsi que miR-31 (Mitamura et al 2013), miR-34a et miR-608 (Zhang et al 2014) miR-181a5p (Korhan et al 2014) ou miR-144-3p (Lan et al 2015). Certains de ces mi-RNA pourraient être utilisés comme des marqueurs pronostics. En effet, des mi-RNA comme miR-30b et miR-30c ont été corrélés avec une bonne réponse aux TKI chez les patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules. Ils pourraient donc être utilisés comme marqueurs prédictifs d'une bonne réponse aux traitements chez ces patients (Gu et al 2013).

Certains facteurs environnementaux comme l'hypoxie influent également sur l'expression de MET (Eckerich et al 2007, Pennacchietti et al 2003, Scarpino et al 2004). Je détaillerai cette partie dans le chapitre consacré à l'hypoxie (chapitre II, paragraphe F, page 109).

De plus et comme décrit précédemment, MET interagit avec des protéines membranaires capables de favoriser son clivage comme LRIG1, dont l'extinction entraîne la surexpression de récepteur (Shattuck et al 2007). A l'inverse, la tensine 4 favorise sa stabilisation dans les cancers du côlon et de l'ovaire (Muharram et al 2014).

Dans certains cas, la surexpression de MET est due à une amplification génique. Contrairement à la surexpression de MET liée à d'autres mécanismes, l'amplification génique du récepteur mène à son expression massive qui conduit à son activation sans présence de ligand. Ces surexpressions ont été déterminées par IHC (*ImmunoHistoChemistry*) et FISH (Hybridation *in situ* en fluorescence) et de nombreuses copies du gène *met* ont été observées dans plusieurs types de cancers comme les cancers gastriques ou pulmonaires (Herrick et al 2000, Toschi and Cappuzzo 2010, Zeng et al 2008). Une étude récente a évalué par FISH la fréquence des amplifications géniques chez 1115 patients atteints de différents cancers solides. Cette fréquence a été de l'ordre de 2.6% (avec une fréquence de 15% dans les tumeurs de la surrenale, 14% dans les tumeurs rénales, 6% dans les cancers gastro-oesophagiens, 5% dans les cancers du sein et 4% dans les cancers ovariens) (Jardim et al 2014). Certaines lignées issues de ces cancers sont fréquemment utilisées en recherche comme la lignée GTL16 issue de cancer gastrique et contenant 11 copies de *met* (Kawakami et al 2014, Ponzetto et al 1991, Smolen et al 2006).

Par ailleurs, et comme décrit précédemment, la perte du domaine juxtemembranaire de MET suite à la délétion de l'exon 14 mène à un défaut de recrutement de l'E3 ubiquitine ligase c-CBL et induit de ce fait une diminution de l'internalisation et la dégradation du récepteur, conduisant donc à sa surexpression.

E.3. L'hypersecrétion du ligand :

Tout comme celle de MET, la surexpression de l'HGF/SF est présente dans de nombreux cancers comme dans le cancer gastrique ou le cancer colorectal et est

associée à un mauvais pronostic et un phénotype plus agressif (voir tableau 1) (Niki et al 1999, Siegfried et al 1997, Toi et al 1998, Toiyama et al 2009, Yamashita et al 1994).

Le rôle transformant de l'HGF/SF a été démontré *in vivo* dans des modèles de souris transgéniques surexprimant ce facteur de croissance. En effet, une étude a démontré que les souris surexprimant l'HGF/SF dans tout l'organisme développaient spontanément différents cancers de types mélanomes, carcinomes ou sarcomes (Takayama et al 1997). Par ailleurs, une autre étude a démontré que les souris surexprimant l'HGF/SF dans les glandes mammaires développaient des cancers mammaires après plusieurs gestations, avec progression en métastases pulmonaires pour certaines d'entre elles (Gallego et al 2003).

L'HGF/SF peut agir sur MET de façon autocrine ou paracrine. L'activation autocrine a été montrée dans certaines lignées cellulaires cancéreuses exprimant MET et son ligand où cette expression conjointe favorisait la migration cellulaire et le développement métastatique. Par exemple, il a été démontré, dans la lignée SNU-484 issue de cancer gastrique, que MET était constitutivement phosphorylé dû à une forte sécrétion conjointe de l'HGF/SF. L'utilisation d'anticorps anti-HGF/SF a mené à la baisse de phosphorylation du récepteur ainsi qu'à l'inhibition de la prolifération et la migration cellulaires. Par ailleurs, une étude a démontré que l'utilisation, dans des souris SCID (*Severe Combined Immunodeficiency Disease*), de lignées issues de NSCLC contenant une surexpression conjointe de MET de son ligand a mené à une augmentation de la tumorigénicité ainsi que celle des métastases osseuses, cervicales et rénales (Ferracini et al 1995, Navab et al 2009, Park et al 2005, Rong et al 1994).

Néanmoins, ce mode d'activation autocrine n'est pas aussi fréquent que l'activation paracrine qui serait majoritaire. En effet, l'HGF/SF est sécrété principalement par les fibroblastes mais également par différents types cellulaires constituant le stroma tumoral (cellules musculaires lisses et endothéliales, neutrophiles et macrophages) (Jiang et al 1999). Par ailleurs, par l'intermédiaire d'inducteurs comme la IL-1 β (*InterLeukine-1 β*), le FGF (*Fibroblast Growth Factor*), le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), le TGF α (*Transforming Growth Factor- α*) et la PGE2 (*Prostaglandine E2*), les cellules tumorales sont capables de mener à une augmentation de la sécrétion de

l'HGF/SF par les fibroblastes associés aux cancers (FACs) (Jiang et al 1999, Matsumoto and Nakamura 2006).

Catégorie	Type de cancer	Expression de MET	Expression de l'HGF/SF	Présence de mutations	Mauvais pronostic
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 supérieures	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	Osteosarcome	X	X	X	
	Rhabdomyosarcome	X	X		X
	Sarcome synovial	X	X		X
Sarcome des tissus mous	Sarcome de Kaposi	X	X		
	Sarcome des muscles lisses	X	X		X
	Fibrosarcome	X	X		
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		

Tableau 1 - Tableau des cancers impliquant le couple HGF/SF-MET.

Ce tableau interactif issu du site <http://www.vai.org/met> récapitule dans différents types de cancers la surexpression de MET, de l'HGF/SF, la présence ou non de mutations de MET ou si un mauvais pronostic est associé.

E.4. Notion d'addiction à MET :

L'addiction des cellules à un oncogène est définie par un arrêt de leur prolifération ou l'induction de leur mort suite à une inhibition de cet oncogène, devenu donc indispensable (Weinstein and Joe 2008). Parmi un panel de 500 lignées issues de différents cancers épithéliaux, il a été montré que 7 lignées étaient addictes à MET. En effet, l'utilisation de siRNA ou d'inhibiteurs pharmacologiques comme le PHA-665752, dirigés contre MET, induisaient l'arrêt de prolifération ou la mort de ces cellules en affectant principalement les voies MAPK et PI3K/AKT. Ces lignées présentent toutes une amplification génique de *met*, suggérant un lien entre l'amplification génique et l'addiction. Elles sont par ailleurs principalement d'origine pulmonaires ou gastriques (Bertotti et al 2009, Christensen et al 2003, McDermott et al 2007, Scagliotti et al 2013, Smolen et al 2006). De même, il a récemment été montré que des lignées cellulaires ayant une délétion de l'exon 14 présentent également une addiction à MET. Ainsi, L'amplification génique de *met* et la délétion de l'exon 14 sont deux phénomènes menant à une surexpression de MET et son activation indépendante du ligand rendant les cellules addictes à l'activité du récepteur. De manière intéressante, des études récentes ont montré que les patients répondant aux traitements anti-MET avaient soit une amplification génique de *met* ou une délétion de l'exon 14, suggérant que l'efficacité du traitement est lié à une addiction à MET. En effet, le phénomène d'addiction à un oncogène semble être l'une des raisons du succès clinique de nombreux TKI comme le géfitinib ciblant l'EGFR (McDermott et al 2007). Cette notion de sensibilité aux traitements sera abordée plus loin au niveau du paragraphe F.4 page 82.

E.5. Interactions de MET avec d'autres RTK :

MET est connu pour interagir avec plusieurs autres RTK. Par exemple, il interagit avec le Récepteur d'Origine Nantais (RON), récepteur très homologue à MET et appartenant à sa famille. Le dialogue entre MET et RON a été reporté *in vitro* dans différents modèles expérimentaux et a été confirmé dans les cancers du foie, de l'ovaire, du sein et de la vessie. Il a été démontré que l'ajout de l'HGF/SF ou l'activation constitutive de MET permettait l'activation de RON. De même, l'ajout de MSP (*Macrophage Stimulating Protein*, ligand de RON) permet d'activer MET (Maggiola et al

2003). Par ailleurs, ces deux récepteurs peuvent se *trans*-phosphoryler. En effet, RON peut être spécifiquement *trans*-phosphorylé par MET mais pas par EGFR ou HER2. Il a également été démontré que des TKI spécifiques de MET inhibaient la phosphorylation de RON. Ceci démontre que ces RTK peuvent dialoguer entre eux et coopérer dans leur signalisation intracellulaire (Follenzi et al 2000, Lee et al 2005).

Par ailleurs, des ligands d'autres RTK ont été montrés comme pouvant activer MET. En effet, le GDNF (*Glial cell Derived Neurotrophic Factor*, ligand de RET et de GFR α 1) induit la phosphorylation du récepteur MET sans qu'il n'y ait de liaison directe entre ce ligand et le récepteur. Par ailleurs, il a également été décrit que l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*, ligand de l'IGFR) induisait l'activation du récepteur MET dans une lignée issue du cancer de la prostate (Popsueva et al 2003, Varkaris et al 2013).

Le dialogue MET/EGFR est le plus étudié puisqu'il a des conséquences importantes dans la régulation des réponses biologiques, le développement et la tumorigenèse (Guo et al 2008). Plusieurs mécanismes décrivant les interactions entre MET et l'EGFR ont été rapportés. En effet, tout comme RON, l'EGFR peut physiquement se lier à MET et former un hétérodimère activant les deux récepteurs par *trans*-phosphorylation. Cette interaction a été confirmée par des techniques de co-immunoprécipitation et a été détectée dans les cellules tumorales épidermiques et pulmonaires (Guo et al 2008, Jo et al 2000). Néanmoins, d'autres données indiquent que c'est l'activation de Src, une tyrosine kinase cytoplasmique, par MET, qui permettait l'activation de l'EGFR sans qu'il n'y ait d'interaction directe entre MET et l'EGFR (Mueller et al 2008, Mueller et al 2010). Par ailleurs, l'ajout de l'HGF/SF permet l'activation de l'EGFR/ErbB1, ErbB2/HER2 et ErbB3/HER3 et à l'inverse, l'ajout d'EGF ou TGF α (*Transforming Growth Factor alpha*) (ligands de l'EGFR) ou encore la présence de formes constitutivement actives de l'EGFR permettent d'activer le récepteur MET (Huang et al 2007, Jo et al 2000, Lai et al 2009). Ces interactions fonctionnelles entre MET et l'EGFR sont également impliquées dans l'établissement de résistances au géfitinib, un inhibiteur spécifique de l'EGFR, et que je détaillerai dans le paragraphe G page 83.

E.6. Implication de MET dans la métastase cancéreuse :

La surexpression de MET et de l'HGF/SF a été évaluée dans des cancers gastriques de stade IV dans deux groupes différents ayant ou pas des métastases pulmonaires. Les résultats obtenus montrent une surexpression de MET plus élevée dans le groupe de patients avec métastases pulmonaires par rapport au groupe sans métastases. La surexpression de MET a également été corrélée avec la survenue de métastases dans le cancer des voies aérodigestives (Amemiya et al 2002, Cortesina et al 2000). Une autre étude a également montré que l'expression de l'HGF/SF est fortement augmentée au niveau des sites métastatiques de ces cancers. Ces résultats suggèrent que l'HGF/SF joue un rôle important dans l'invasion et la métastase dans ces cancers et qu'un niveau élevé d'HGF/SF peut être un marqueur prédictif de la formation de métastases chez les patients avec un cancer des voies aérodigestives supérieures (Uchida et al 2001). Par ailleurs, la capacité de la signalisation HGF/SF-MET à induire des métastases a été démontrée expérimentalement dans des xénogreffes de cellules tumorales du cancer du sein transfectées avec l'HGF/SF ou MET mais également dans des souris transgéniques qui surexpriment l'HGF/SF ou MET (Gallego et al 2003, Meiners et al 1998).

F. MET et les thérapies ciblées :

Des stratégies d'inhibition du couple HGF/SF-MET sont actuellement en cours de développement avec de nombreuses molécules déjà à l'essai en études de phase I, II ou III (Serrate et al 2011) (figure 18 et tableau 2). Ces stratégies peuvent être regroupées en trois types : des peptides compétiteurs de l'interaction HGF/SF-MET, des anticorps monoclonaux ciblant MET ou l'HGF/SF, inhibant principalement la liaison ligand/récepteur, et des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de MET (TKI).

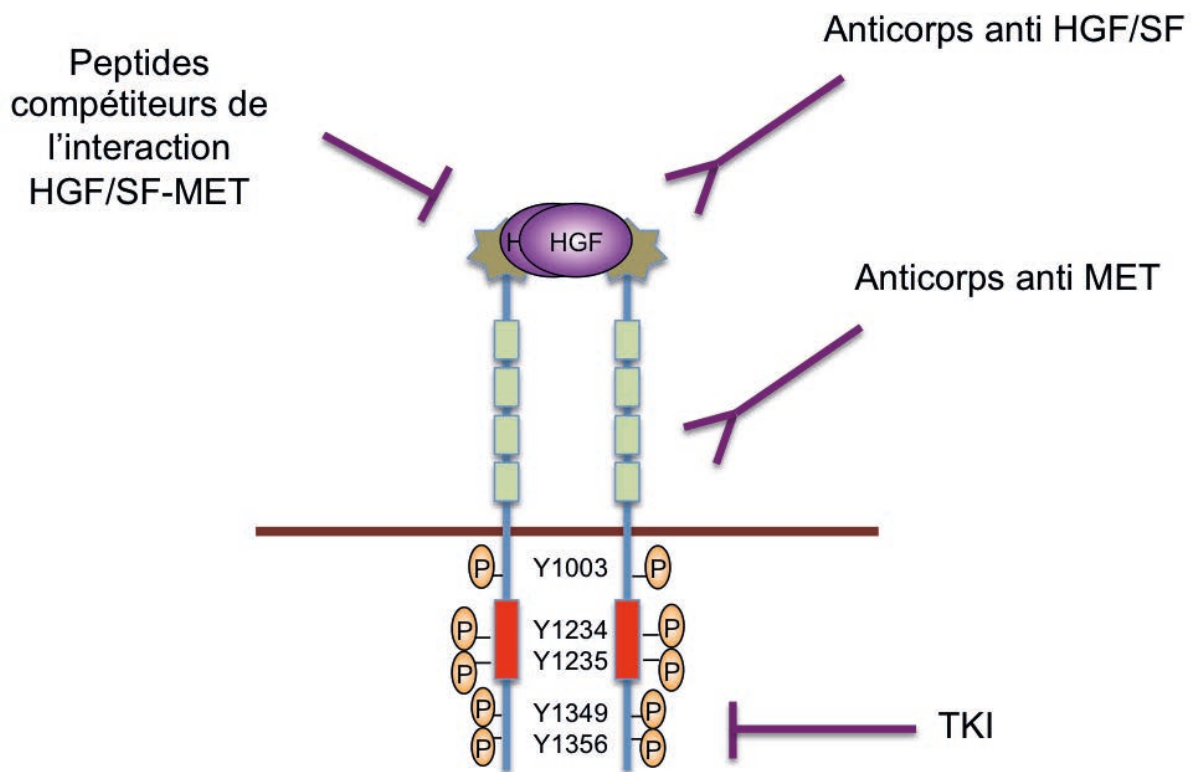


Figure 18 - Principales stratégies d'inhibition du récepteur MET. Tiré de (Serrate et al 2011).

Trois types de stratégies d'inhibition du couple HGF/SF-MET sont en cours de développement : des peptides compétiteurs de l'interaction HGF/SF-MET, des anticorps monoclonaux ciblant MET ou l'HGF/SF et des Inhibiteurs de Tyrosine Kinase (TKI).

F.1. Molécules compétitrices de l'interaction HGF/SF-MET (molécules antagonistes de l'HGF/SF et de MET) :

Ces compétiteurs sont des sous-domaines soit de l'HGF soit de MET capables de bloquer l'interaction ligand/récepteur. Leur efficacité a été évaluée sur des modèles cellulaires et des modèles murins de tumorigenèse mais n'a pas encore été évaluée d'un point de vue clinique. Les antagonistes constitués de sous domaines de l'HGF/SF sont inspirés de variants naturels de l'HGF/SF comme NK2 (composé du domaine N et du domaine Kringle 2 de l'HGF/SF) et NK4 (composé uniquement de la chaîne α). Ainsi, NK2 se fixe sur MET mais n'induit pas son activation. En effet, une étude a démontré que le NK2 était en une conformation « fermée » empêchant ainsi sa dimérisation. Cette conformation empêche de ce fait l'activation de MET ainsi que la prolifération cellulaire normalement observée suite à une stimulation par l'HGF/SF (Chan et al 1993, Date et al 1997, Miyazawa et al 1991, Montesano et al 1998, Tolbert et al 2010). Par ailleurs, il a

également été démontré que le NK4 se fixe sur MET sans l'activer. En effet, une étude a montré *in vivo* que des traitements par NK4 ont une action anti-tumorale associée à une perte de l'activation du récepteur MET. De plus, NK4 présente des propriétés anti-angiogéniques indépendamment de la signalisation de MET. En effet, dans des cellules endothéliales, NK4 s'associe avec le perlecan (protéoglycane de la matrice extracellulaire) et inhibe l'assemblage de la fibronectine bloquant ainsi la liaison des intégrines à la matrice extracellulaire. NK4 inhibe donc la signalisation dépendante de l'ancrage cellulaire et de ce fait les signaux pro-angiogéniques qui en découlent (Mizuno and Nakamura 2013, Sakai et al 2009).

Les sous-domaines de MET sont quant à eux des leurres à l'HGF/SF. Ils sont soit constitués du domaine SEMA, soit de toute la région extracellulaire de MET fusionnée à la région Fc des anticorps (MET-Fc) pour permettre notamment leur purification. Ces sous domaines se lient à l'HGF/SF et jouent donc un rôle de leurre (« *decoy* »). En effet, il a été démontré que MET-Fc se lie à l'HGF/SF et inhibe de ce fait sa fixation sur MET et son activation. Lors de son utilisation, il a été observé une inhibition de l'invasion cellulaire *in vitro* dans des cellules issues de cancer de la prostate (PC3). L'utilisation de ces *decoy* a également mené, dans de nombreuses études, à une inhibition de la croissance tumorale *in vivo* dans des xénogreffes de tumeurs (Coxon et al 2009, Michieli et al 2004). Néanmoins, ces molécules sont encore en développement et peinent à trouver un intérêt en clinique. En effet, leur instabilité et la difficulté à les synthétiser rendent leur utilisation en clinique difficile à mettre en œuvre.

F.2. Anticorps monoclonaux ciblant l'HGF/SF ou MET (anticorps bloquants) :

Ces anticorps monoclonaux (MAb pour *Monoclonal Antibody*) ciblent spécifiquement soit l'HGF/SF soit MET inhibant ainsi leur interaction. Avec les TKI, ils sont les candidats dont le développement pour l'obtention de médicaments est le plus avancé. Ils sont généralement monovalents afin d'éviter la dimérisation du récepteur parfois observée avec les anticorps bivalents. Ils sont également humanisés afin de prévenir leur reconnaissance par le système immunitaire et leur rapide élimination

(Ahmadzadeh et al 2014, Martens et al 2006, Pacchiana et al 2010, Prat et al 1998, Vigna and Comoglio 2015).

Certains MAb ciblent l'HGF/SF, comme le rilotumumab (AMG-102). Ce MAb est actuellement en phase II d'essai clinique où il a montré une capacité à augmenter la survie globale des patients en traitement combinatoire avec une chimiothérapie dans les cancers gastriques ou de la jonction œsophagienne (Iveson et al 2014). Néanmoins, il semble avoir peu d'effets en monothérapie dans d'autres types de cancers comme les carcinomes rénaux ou les glioblastomes (Schoffski et al 2011, Wen et al 2011). Une étude en phase III est en cours pour évaluer son efficacité chez des patients atteints de cancers gastriques et de la jonction œsophagienne et surexprimant MET (Scagliotti et al 2013). D'autres MAb, comme le DN-30, se lient à MET et favorisent sa rapide dégradation en favorisant son clivage protéolytique par le PS-RIP (voir paragraphe B.4.2.2 page 42). Cet anticorps était initialement bivalent et induisait une activation partielle du récepteur mais inhibait l'invasion et la croissance sans ancrage *in vitro*. Il limitait également *in vivo* la croissance et la métastase tumorales dans un modèle de xénogreffes de cellules addictes à MET. Plus tard, une forme monovalente de l'anticorps a été développée afin d'empêcher cette activation partielle, menant à une efficacité d'inhibition plus élevée (Foveau et al 2009, Pacchiana et al 2010, Petrelli et al 2006, Vigna and Comoglio 2015). Enfin, d'autres MAb ciblent le récepteur MET et empêchent sa liaison avec l'HGF/SF comme l'onartuzumab (MetMAb ou 5D5). Des résultats prometteurs ont été obtenus avec cet anticorps en phase II notamment en association avec des inhibiteurs de l'EGFR dans le cancer du poumon non à petites cellules. Néanmoins, les essais en phase III sur cet anticorps ont été arrêtés l'année dernière en raison d'un manque d'efficacité (Spigel et al 2013, Spigel et al 2014). Une des raisons possibles de cet échec est qu'il pourrait être lié au choix de la population cible. En effet, cette étude a été effectuée chez des patients présentant une surexpression de MET, or une surexpression n'est pas systématiquement associée à une activation du récepteur (Tsuta et al 2012).

F.3. inhibiteurs du domaine tyrosine-kinase de MET :

Les TKI (pour *Tyrosine Kinase Inhibitors*) sont de petites molécules hydrophobes.

Ces TKI peuvent agir par différents mécanismes mais la majorité inhibe directement l'activité catalytique de la kinase en interférant avec la liaison de l'ATP. D'autres inhibent l'activité des tyrosines kinases de manière allostérique. En effet, ces molécules se fixent sur des domaines autres que les sites actifs et induisent un changement conformationnel maintenant l'enzyme dans une conformation inactive. De plus, la stabilité de certaines protéines kinases, comme le RTK HER2, est régulée par leur liaison à des protéines chaperonnes comme la protéine Hsp90 (*heat shock protein 90*). Certains TKI peuvent inhiber l'interaction de ces RTK avec ces protéines chaperonnes, menant ainsi à leur dégradation. Certains TKI sont spécifiques à une cible (comme le géfitinib qui est un inhibiteur spécifique de l'EGFR) tandis que d'autres sont multi-cibles (comme le crizotinib ciblant à la fois ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*), MET et ROS1) (Krause and Van Etten 2005, Polier et al 2013).

Parmi les premiers TKI ciblant MET mis au point nous pouvons citer le SU11274 et le PHA-665754. Ces TKI présentent une forte toxicité hépatique et rénale mais sont encore utilisés actuellement en recherche fondamentale. Par la suite, d'autres TKI présentant une moindre toxicité et une meilleure tolérance ont été développés (Scagliotti et al 2013). Parmi ceux-ci se trouvent le tivantinib (ARQ 197) un inhibiteur allostérique spécifique de MET. En effet, il se lie sur le domaine kinase du récepteur et le maintient dans une conformation inactive de façon non compétitive à l'ATP (Eathiraj et al 2011). Des études *in vivo* ont démontré l'activité anti-tumorale du tivantinib en monothérapie et en traitement combinatoire dans des modèles humains de cancers du poumon, foie et côlon. Des essais de phase II ont démontré l'efficacité du tivantinib en association avec l'erlotinib (un TKI ciblant l'EGFR) dans le NSCLC. En effet, ce traitement combinatoire apportait une meilleure survie sans progression (*Progression-Free Survival*) ainsi qu'une meilleure survie globale (*Overall Survival*) principalement chez les patients avec une amplification génique de *met* (Sequist et al 2011). Par la suite, une étude de phase III a été menée sur ce même type de patients (avec NSCLC). Cette étude a dû être arrêtée prématurément du fait d'un manque de bénéfice dans la survie globale. De plus, le tivantinib a été étudié en monothérapie de seconde ligne dans le traitement de l'hépatocarcinome. L'étude de phase II a montré une amélioration de la survie globale principalement dans le sous-groupe de patients surexprimant MET. Une étude de phase

III est actuellement en cours pour évaluer son efficacité chez ce type de patients (Santoro et al 2013, Scagliotti et al 2013).

D'autres inhibiteurs sont des TKI multi-cibles comme le cabozantinib (XL 184) qui cible MET, VEGFR2 et RET et le crizotinib (PF 02341066) qui cible ALK, MET et ROS1. Le cabozantinib est actuellement en phase II d'essai clinique dans plusieurs types de cancers solides (mélanomes, NSCLC, cancer mammaire métastatique et cancer de la prostate résistant à la castration). Les résultats de cette étude ayant été encourageants, une étude de phase III a été initiée avec des patients avec un cancer métastatique de la prostate résistant à la castration et préalablement traités par des chimiothérapies et des anti-androgènes (Scagliotti et al 2013).

Quant au crizotinib, il est actuellement utilisé en clinique dans le traitement des cancers pulmonaires non à petites cellules présentant un réarrangement de ALK et donc son activation constitutive (Lantuejoul et al 2015). Néanmoins, ce TKI a montré une efficacité dans le NSCLC présentant une amplification génique de *met* sans réarrangement ALK ainsi que dans le cancer œsophagien avec amplification génique de *met* (Ou et al 2011).

Par ailleurs, puisque MET est également dérégulé dans les cancers du poumon non à petites cellules, des patients présentant une amplification de *met* ont été traités par le crizotinib dans le cadre « de traitements hors AMM » ou d'essais cliniques. Ainsi, le programme français AcSé a permis de montrer l'efficacité du crizotinib dans le cancer du poumon non à petites cellules et présentant une amplification de *met*. En effet, sur 25 patients, 8 d'entre eux (32%) ont montré une réponse partielle (PR *Partial Response*) et 7 (28%) une stabilisation de la maladie (SD *Stabilization Disease*) (Vassal et al 2015). De plus, l'efficacité du crizotinib a été montrée dans plusieurs études chez des patients présentant des mutations induisant la délétion de l'exon 14 dans le NSCLC (Frampton et al 2015, Paik et al 2015).

	Inhibiteur	Nom	Entreprise	Phase I/II	Phase III/ (IV)	Approbation pour utilisation Clinique	
Anticorps monoclonaux contre HGF	Ficlatuzumab	AV-299/ (SCH-900105)	AVEO Pharmaceuticals	X			
	Rilotumumab	AMG 102	Amgen	X	X		
		TAK 701	Millennium Pharmaceuticals	X			
Anticorps monoclonaux contre MET	Onartuzumab	MetMab	Genentech /Roche	X	X		
		LY 2875358	Eli Lilly	X			
Inhibiteur de tyrosine kinase dirigé contre MET		AMG 208	Amgen	X			
		AMG 337	Amgen	X			
		Tivantinib	ARQ 197	ArQule	X		X
		Golvatinib	E 7050	Eisai	X		
		SAR 125844	Sanofi	X			
		ASLAN002/ BMS 777607	Bristol-Myers Squibb / Aslan Pharmaceuticals	X			
		EMD 1204831	EMD Serono	X			
		EMD 1214063	EMD Serono	X			
		INC 280/ INCB 028060	Novartis	X			
		PF 04217903	Pfizer	X			
		JNJ 38877605	Johnson & Johnson	X			
Inhibiteur de tyrosine kinase dirigé contre plusieurs cibles		MGCD 265	MethylGene	X		<p>CBNPC avec un réarrangement du gène ALK, en monothérapie contre chimiothérapie conventionnelle, en 1ère ligne ou 2nde ligne.</p> <p>Cancer médullaire de la thyroïde métastasé et en progression; cancer métastasé de la prostate résistant à la castration; carcinome hépatocellulaire.</p>	
	Amuvatinib	MP 470	Astex Pharmaceuticals	X			
	Crizotinib / Xalkori	PF 02341066	Pfizer	X	X (X)		
	Cabozantinib/ Cometriq	XL 184	Exelixis	X	X (X)		
	Foretinib	XL 880/ GSK 1363089	GlaxoSmithKline	X			
		LY 2801653	Eli Lilly	X			

Tableau 2 - MET et les thérapies ciblées dont le développement est actuellement en cours. D'après (Montagne et al 2014).

Liste des principaux essais cliniques évaluant l'efficacité d'anticorps bloquants dirigés contre MET ou l'HGF/SF et des inhibiteurs de tyrosine kinase. Les essais sont répertoriés sous <http://clinicaltrials.gov>.

F.4. Notion de sensibilités aux thérapies ciblées :

En effet, et comme cité précédemment, plusieurs sensibilités aux thérapies ciblées de type TKI ont été décrites récemment et de nombreuses preuves s'accumulent suggérant que des patients ayant un cancer portant des dérégulations particulières du récepteur MET étaient plus répondeurs aux traitements. Par exemple, plusieurs études ont identifié l'amplification génique de *met* comme la dérégulation la plus prédictive d'une sensibilité aux thérapies ciblant MET (Comoglio et al 2008). En effet, l'étude des lignées cellulaires tumorales sensibles au PHA-665752 a montré que toutes les lignées ayant une amplification génique de *met* (dont une avec une délétion de l'exon 14) et issues de cancer gastrique ou de cancers pulmonaires avaient une grande sensibilité à l'inhibition de MET (McDermott et al 2007, Pacchiana et al 2010, Smolen et al 2006). Par ailleurs deux études distinctes ont analysé l'activité de différents agents ciblant MET (PHA-665752, JNJ-388877605, crizotinib et DN30 Fab) sur différentes lignées cellulaires ayant ou pas une amplification génique de *met* et seules celles avec cette amplification étaient sensibles à une inhibition de MET dans des essais de prolifération (Basilico et al 2013, Katayama et al 2013). De plus, et de manière cohérente, un traitement au crizotinib a été bénéfique pour des patients avec une amplification génique de *met* dans différents types de cancers incluant les cancers pulmonaires non à petites cellules et les cancers gastro-œsophagiens. Le crizotinib a également montré son efficacité chez des patients avec une délétion de l'exon 14 (Frampton et al 2015, Lennerz et al 2011, Liu et al 2015, Ou et al 2011, Paik et al 2015, Pennacchietti et al 2014).

Toutes ces données suggèrent que les patients avec une surexpression du récepteur MET en absence d'amplification génique ou de délétion de l'exon 14 ne constitueraient pas une population cible adéquate pour un traitement ciblant MET et pourraient expliquer les échecs en phase III du tivantinib et de l'onartuzumab. En effet, les résultats obtenus ces 10 dernières années tendent à réorienter la stratification des patients vers ceux ayant ces deux types de dérégulations. De ce fait, ces dérégulations sont maintenant recherchées en clinique dans le but d'optimiser les traitements et d'améliorer la réponse des patients.

G. MET et le système immunitaire :

Pendant des décennies, la communauté scientifique a tenté de stimuler une réponse immunitaire anti-tumorale pour combattre le cancer. Néanmoins, l'existence de « points de contrôle immunitaires » (*immune checkpoints*), responsables de la régulation de l'activation immunitaire excessive, semblent être un mécanisme déterminant pour échapper au système immunitaire. Parmi les molécules impliquées dans ce contrôle, ont été identifiées PD1 (*programmed cell death 1*) et CTLA4 qui sont exprimés par des lymphocytes T activés. En effet, leur expression est augmentée dans les tumeurs et la surexpression de PDL1 augmente la tumorigenèse et l'invasion *in vivo* (Iwai et al 2005). De ce fait, leur inhibition par des thérapies ciblées comme le nivolumab et le ipilimumab, a montré une efficacité clinique dans différents types de tumeurs solides comme les mélanomes ou les cancers rénaux (Mahoney et al 2015, Topalian et al 2014, Wolchok et al 2013).

Par ailleurs, il a été démontré que le récepteur MET est non seulement exprimé par les cellules cancéreuses mais également par les cellules stromales associées aux cancers dont les cellules immunitaires (Komarowska et al 2015). Dans une étude récente, Finisguerra et ses collaborateurs ont exploré la fonction de MET dans les leucocytes associés aux tumeurs. Ils ont pu démontrer qu'une délétion de MET dans les neutrophiles est associée avec une augmentation de la croissance et la métastase tumorales chez la souris. Ce phénotype corrèle avec une infiltration réduite des neutrophiles à la fois dans la tumeur primaire et les sites de métastase. En effet, dans les neutrophiles circulants humains et murins MET est induit par certains stimuli inflammatoires comme le TNF α conduisant à une sécrétion de monoxyde d'azote (*nitric oxide* NO). Cette sécrétion favorise la mort cellulaire qui réduit alors la croissance et la métastase tumorales. Ainsi, l'activité de MET est à la fois nécessaire à la progression tumorale et à l'immunité anti-tumorale. Cette étude met donc en avant une faille potentielle dans les thérapies ciblant MET où l'effet des TKI, utilisés pour bloquer la croissance tumorale, mènerait également à l'inhibition de neutrophiles anti-tumoraux exprimant MET (Benarafa 2015, Finisguerra et al 2015).

De ce fait, l'utilisation de thérapies ciblant à la fois les points de contrôle immunitaire et MET serait à prendre avec précaution. En effet, il a été suggéré de combiner des thérapies ciblant PD1 ou CTLA4 avec ceux ciblant MET, notamment dans les cancers gastriques à forte composante inflammatoire (Elimova et al 2015). Néanmoins, puisque il a été montré qu'une inhibition de MET dans les neutrophiles aurait une action inhibant la réponse immunitaire, ce type de traitements combinatoires pourrait induire une action pro-tumorale qui contrecarrerait l'effet anti-tumoral escompté. L'utilisation de ces thérapies serait donc à envisager avec prudence, notamment en évaluant le type de tumeurs, le tissu concerné et la réponse de l'hôte (Benarafa 2015).

H. MET et les résistances aux thérapies ciblées :

H.1. Implication de MET dans les résistances aux thérapies ciblant d'autres RTK :

De nombreuses études ont montré l'implication de MET dans l'établissement de résistances aux traitements (Corso and Giordano 2013).

L'une des grandes limitations des thérapies ciblées est le développement fréquent de résistances. En effet ces résistances contournent plus facilement l'inhibition puisque celle-ci est restreinte à une cible spécifique. D'une manière générale, plusieurs mécanismes de résistance aux nouvelles thérapies ciblant les RTK ont été répertoriés. Certaines d'entre elles impliquent l'activation de MET (figure 19). Par exemple, suite à l'utilisation d'un ATP mimétique ciblant l'EGFR, le géfitinib, les patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules développent des résistances *via* des mutations de l'EGFR (50%), notamment la mutation T790M, principale mutation associée à une résistance aux TKI, mais également *via* la surexpression de MET (22%). En effet, MET active le récepteur ErbB3 et la voie AKT, favorisant ainsi la survie cellulaire (Engelman et al 2007). L'amplification génique de *met* a également été associée à une résistance à l'erlotinib, un autre inhibiteur de l'EGFR (Bean et al 2007, Engelman et al 2007, Suda et al 2010).

Par ailleurs, une surexpression de l'HGF/SF peut également être une cause de résistance (figure 19). En effet, des études ont démontré que l'HGF/SF permettait l'activation des voies PI3K/AKT et ERK en présence de géfitinib menant à une résistance à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cependant, contrairement aux cancers résistants *via* une amplification de *met* qui mène à une *trans*-phosphorylation de HER3, la résistance médiée par l'HGF/SF est liée au recrutement de l'adaptateur GAB1. Par ailleurs, des niveaux élevés d'HGF/SF ont pu être détectés dans des tumeurs de patients avec un NSCLC et qui sont résistants au géfitinib ou à l'erlotinib. Notamment, chez certains patients sans amplification génique de *met* et sans mutation T790M de l'EGFR, l'expression de l'HGF/SF est plus élevée chez les patients résistants au traitement (Turke et al 2010, Yamada et al 2010, Yano et al 2008). De manière cohérente, d'autres études ont montré que cette résistance aux TKI ciblant l'EGFR est associée à une expression de l'HGF/SF plus élevée à la fois dans le microenvironnement tumoral et le plasma (Donev et al 2011, Han et al 2011, Yano et al 2008, Yano et al 2011). Ces résultats suggèrent que même si l'amplification de *met* a été détectée dans environ 22% des patients mutés EGFR et développant une résistance au géfitinib et à l'erlotinib dans le NSCLC, l'activation de MET (à la fois par amplification et suite à une activation par l'HGF/SF) pourrait en fait concerner une proportion plus importante des tumeurs résistantes à ces deux TKI.

A noter que deux études récentes ont investigué l'effet des facteurs de croissance sur la réponse aux agents anticancéreux en utilisant un large panel de cellules humaines cancéreuses ou addictes aux oncogènes. Ces études ont identifié l'HGF/SF comme un facteur issu du microenvironnement important dans l'établissement des résistances (Straussman et al 2012, Wilson et al 2012).

Dans un autre registre, il a été démontré que les patients avec un cancer colorectal et traités par des inhibiteurs de l'EGFR (comme le cétuximab) développaient des résistances principalement *via* l'émergence de mutations *kras* dans environ 50% des cas (Amado et al 2008, Karapetis et al 2008). Néanmoins, une autre étude a démontré que l'amplification de *met* était également associée avec une résistance aux anti-EGFR à la fois *in vitro* et *in vivo* en absence de mutations *kras*. En effet, dans des xénogreffes chez la souris de tumeurs colorectales humaines, l'amplification de *met* a été corrélée avec

une résistance à l'inhibition de l'EGFR qui a pu être surmontée par les TKI ciblant MET comme le crizotinib et JNJ-38877605 (Bardelli et al 2013).

De plus, la surexpression de MET a été observée dans le cadre de résistances au trastuzumab (MAB ciblant ErbB2). En effet, une étude a démontré que l'activation de MET protégeait les cellules issues du cancer du sein contre l'action du trastuzumab en inhibant l'induction de p27, un inhibiteur de kinase dépendant de la cycline. De plus, la surexpression de HER2 (ErbB2) dans ces cellules a conduit à une augmentation de l'expression de MET menant également à une résistance (Shattuck et al 2008).

A noter que les résistances aux traitements anti-cancéreux ne concernent pas uniquement les thérapies ciblées mais concernerait également la radiothérapie. En effet, d'après certaines études, MET est impliqué dans la réparation de l'ADN après exposition à des radiations ionisantes (Buchanan et al 2011, Welsh et al 2009). L'utilisation du PHA-665752, a montré qu'il rendait les cellules cancéreuses gastriques radio-sensibles et empêchait la réparation par recombinaison homologue des cassures d'ADN dans de nombreuses cellules cancéreuses (comme les GTL16) (Medova et al 2010, Medova et al 2012).

H.2. Résistances aux thérapies ciblant MET :

Même si des inhibiteurs de MET sont en développement, on peut d'ores-et-déjà observer l'établissement de certaines résistances. En effet, des études ont montré, à partir de modèles cellulaires de cancers gastriques et du cancer pulmonaire non à petites cellules, qu'une résistance aux inhibiteurs de MET est induite par une amplification génique de *met* suivie d'une amplification génique de *kras*. Ainsi, une étude a utilisé des lignées MET-dépendantes issues de cancer gastrique et de NCLSC (GTL16 et EBC-1 respectivement) traitées par des doses croissantes de TKI ciblant MET, induisant ainsi des résistances. Ces cellules résistantes présentent une amplification de *met* et de *kras*. Les cellules avec amplification *kras* ont progressivement perdu leur dépendance à MET au profit d'une dépendance à KRAS. Par ailleurs, d'autres mécanismes ont également pu être observés, comme l'acquisition de mutations activatrices (au niveau de la tyrosine Y1230) menant à un changement de conformation de MET limitant ainsi la

capacité des TKI utilisés à se lier au récepteur (Cepero et al 2010, Qi et al 2011). Pour l'instant ces résultats ont été obtenus *in vitro* mais anticipent probablement les futures résistances en clinique suggérant une extrême prudence quant à l'utilisation de ces TKI ciblant MET.

Par ailleurs, et de façon miroir, tout comme l'activation de MET peut court-circuiter l'inhibition de l'EGFR, l'activation de l'EGFR peut également court-circuiter une inhibition de MET. En effet, une étude a démontré que l'activation de l'EGFR et ErbB3 permet à des cellules MET-dépendantes d'échapper à l'inhibition par des TKI ciblant MET (figure 19) (Bachleitner-Hofmann et al 2008).

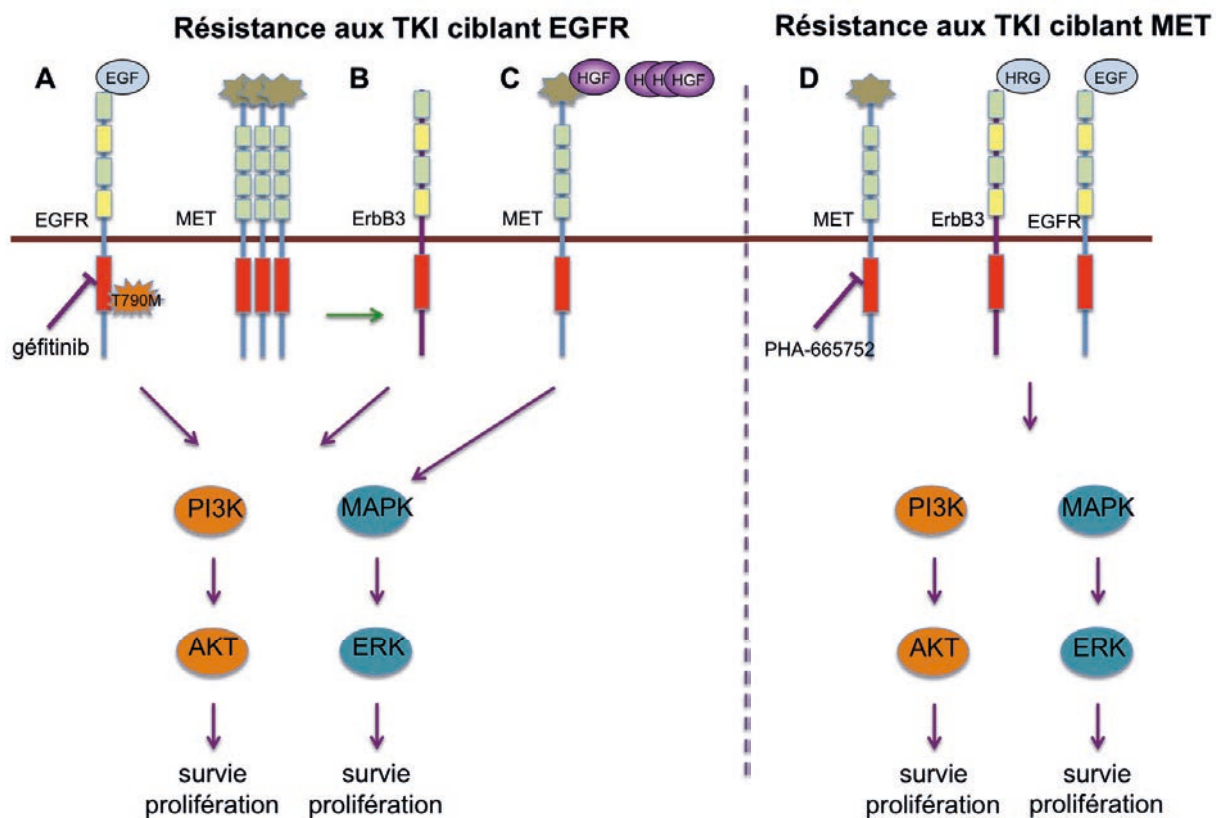


Figure 19 – Résumé schématique de certains mécanismes moléculaires menant aux résistances acquises aux TKIs. Inspiré de (Chen 2011) et (Bachleitner-Hofmann et al 2008).

Résistances aux TKI ciblant EGFR : (A) Mutations dans le domaine kinase de l'EGFR, comme la mutation T790M, peuvent mener à la diminution ou l'abolition de l'effet inhibiteur du traitement. (B) Amplifications géniques comme celles de *met* menant à la surexpression du récepteur pouvant conférer une résistance aux inhibiteurs. (C) Surexpression des ligands des RTK menant à l'activation sans contrôle des cellules tumorales (exemple de l'HGF/SF).

Résistances aux TKI ciblant MET : (D) l'inhibition de MET par le PHA-665752 est surmontée par l'utilisation de l'EGF (qui active l'EGFR) et de la HRG (heregulin β 1- qui active ErbB3) et donc l'activation des voies de signalisation MAPK/ERK et PI3K/AKT.

De manière globale, la signalisation HGF/SF-MET est au cœur des manœuvres thérapeutiques actuelles. Il est maintenant évident que des interactions entre les RTK favorisent les résistances, incitant la communauté scientifique à élaborer des combinaisons thérapeutiques permettant de cibler plusieurs récepteurs. En effet, certaines résistances thérapeutiques passent par l'activation de protéines capables de court-circuiter l'inhibition de la protéine cible. Le développement de thérapies multi-cibles pourrait donc représenter une alternative intéressante. A cet effet, l'efficacité de l'inhibition de l'EGFR, MET et VEGFR a été démontrée dans des lignées cellulaires issues du cancer du poumon présentant une mutation de l'EGFR. En effet, comme dit précédemment, il a été démontré l'existence d'une résistance aux TKI ciblant l'EGFR dans le cancer du poumon avec mutation de l'EGFR. Cette résistance est établie *via* une activation de MET, qu'elle soit par amplification génique ou par l'intermédiaire de l'HGF/SF. Il a également été démontré que la surexpression de l'HGF/SF stimulait la production du VEGF et favorisait ainsi l'angiogenèse dans des lignées issues du cancer du poumon avec mutation EGFR (Takeuchi et al 2012). De ce fait, dans leur étude, Nakade et *al.* ont voulu analyser l'effet d'une triple inhibition sur la résistance des cellules issues du cancer du poumon avec mutation EGFR. Ainsi, trois TKI ont été utilisés : l'erlotinib (ciblant l'EGFR), le crizotinib (ciblant ALK, MET et ROS1) et le bevacizumab (MAB anti-VEGF). Le TAS-115, un TKI développé récemment ciblant MET et VEGFR2, a également été utilisé. L'équipe a pu ainsi démontrer l'efficacité de cette triple inhibition, qu'elle soit *via* l'utilisation de l'erlotinib, crizotinib et bevacizumab ou *via* l'utilisation du TAS-115 en association avec l'erlotinib (Nakade et al 2014).

Par ailleurs, il a été démontré qu'un traitement par un anticorps anti-VEGF ou par le sunitinib (TKI multi-cibles ciblant entre autres le VEGFR) induit une baisse de la masse tumorale mais une augmentation de l'invasion et des métastases. Ces réponses invasives sont accompagnées d'une augmentation de l'hypoxie tumorale et de HIF1a ainsi qu'une augmentation de l'expression et de la phosphorylation de MET. L'inhibition de MET par des TKI spécifiques mono ou multi-cibles (respectivement, PF-04217903 et

crizotinib) a permis de réduire ces phénomènes d'invasion et de métastases. Le même résultat a été obtenu en utilisant un TKI ciblant à la fois MET et le VEGFR (cabozantinib). Ceci démontre que l'invasion et la métastase peuvent être favorisées suite à l'inhibition de la voie VEGF/VEGFR *via* une activation de MET. Ceci peut être contrecarré avec un second traitement ciblant MET (Sennino et al 2012). Par ailleurs, l'utilisation du foretinib (TKI ciblant à la fois le VEGFR2 et MET) a montré une forte action anti-angiogénique et une diminution de la croissance et de l'invasion tumorale (You et al 2011). De ce fait, l'association de plusieurs TKI, ou l'utilisation de TKI multi-cibles, ciblant à la fois MET et le VEGFR, semblent être des stratégies thérapeutiques efficaces pour inhiber l'angiogénèse et s'affranchir des mécanismes de résistances.

Il serait par ailleurs intéressant d'envisager une caractérisation plus précise des anomalies moléculaires présentes dans les tumeurs. En effet, comme cité précédemment, de nombreux essais cliniques ont dû être arrêtés prématurément du fait d'un manque d'efficacité. Il apparaît donc indispensable avec les données dont nous disposons actuellement de bien stratifier les patients avant de les inclure dans ces études. Cette stratification pourrait notamment se baser sur la présence d'amplification génique de *met* ainsi que sur la présence de mutations, principalement la détection de la délétion de l'exon 14, en utilisant des techniques de séquençage haut débit ou de nouvelle génération (*New Generation Sequencing*) ainsi que par l'intermédiaire de techniques détectant la phosphorylation de MET, comme l'IHC et FISH. En effet, il semblerait que la forme phosphorylée du récepteur ou la présence d'une surexpression de l'HGF/SF pourraient être de bons marqueurs de diagnostic et de réponse aux traitements.

Chapitre II : L'Hypoxie.

L'hypoxie est une composante importante et indissociable du microenvironnement tumoral. La question de son rôle dans le cancer, ses effets sur le plan moléculaire et clinique ainsi que sa détection par la cellule et son rôle dans les traitements cancéreux a fait l'objet de nombreuses études et sera discuté dans ce chapitre.

A. Quelques notions générales sur le concept d'hypoxie :

Le mot « hypoxie » vient du grec « *hupo* » : sous, et « *oxus* » : oxygène, et est donc défini comme un niveau d'oxygène bas. Cet état d'oxygénation insuffisant de certaines cellules s'observe dans des situations physiologiques durant le développement embryonnaire par exemple. En revanche, cet état est également présent dans des événements pathologiques (ischémie, athérosclérose, psoriasis, diabète, maladie d'Alzheimer, dérégulations inflammatoires et cancer).

L'air ambiant contient 21% d'oxygène (à 1013 hPa ou 760 mm Hg), ce qui consiste en une pression partielle équivalente à 150 mm Hg. Néanmoins, la plupart des tissus de mammifères sont soumis à une pression partielle d'oxygène comprise entre 2 et 9% d'O₂ (en moyenne 40 mm Hg). L'hypoxie est généralement définie comme un niveau inférieur à 2% d'O₂ alors que l'hypoxie sévère ou l'anoxie est définie comme étant inférieure à 0.02% d'O₂ (Bertout et al 2008).

B. Détection et adaptations cellulaires à l'hypoxie :

Comment les cellules détectent et corrigent le manque ou la baisse du niveau d'oxygène et comment la transcription génique est régulée par l'hypoxie étaient des questions complètement ouvertes jusqu'à la découverte de la famille des *Hypoxia Inducible Factors* (HIFs) dans les années 90. Par la suite, d'autres effets de l'hypoxie sur les processus cellulaires et indépendants de la protéine HIF ont été identifiés.

B.1. Les Hypoxia Inducible Factors (HIFs) :

La détection cellulaire de l'hypoxie est médiée par une famille de facteurs de transcription appelée HIF. « HIF1 », un membre de cette famille, a été décrit pour la première fois par Gregg Semenza et Guang Wang comme un facteur nucléaire induit en conditions hypoxiques. Ce facteur se lie sur une séquence particulière du gène de l'érythropoïétine (EPO) appelée HRE (*Hypoxia Responsive Elements* : 5'-TACGTGCT-3') et favorise son activation transcriptionnelle dans des cellules privées d'oxygène (Semenza and Wang 1992, Wang and Semenza 1993).

Les HIFs forment des complexes hétérodimériques composés d'une sous-unité α dont l'expression est dépendante de l'oxygène et d'une sous-unité β exprimée constitutivement et non dépendante de l'oxygène, également appelée ARNT (pour *Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator*). Ces deux sous-unités sont membres de la famille de bHLH-PAS (polypeptides avec une basic-helix-loop-helix et contenant le domaine PAS). Trois isoformes de la sous-unité α (HIF1a, HIF2a, HIF3a) et deux isoformes de la sous-unité β ont été décrites comme contribuant à la réponse *in vivo* à l'hypoxie. Des trois isoformes de HIFa, HIF1a et HIF2a ont été plus intensément caractérisées et étudiées (Simon and Keith 2008). HIF1a est celle qui a été identifiée en premier mais est également celle qui est la plus ubiquitaire. HIF2a et HIF3a ne sont retrouvées que dans un nombre réduit de tissus. En effet, HIF2a est limité à l'endothélium vasculaire, le parenchyme hépatique, les pneumocytes pulmonaires de type II et les cellules épithéliales rénales alors que HIF3a est retrouvé en de fortes proportions dans le thymus, les cellules cérébrales de Purkinje et l'épithélium coronarien de l'œil. Par ailleurs, alors que HIF1a est responsable d'un grand nombre d'adaptations cellulaires (chapitre II paragraphe B.4 page 93), HIF2a se lie également aux HRE et augmente l'expression d'un nombre plus restreint de gènes (Jain et al 1998, Tian et al 1997, Wiesener et al 2003). En revanche, HIF3a (appelé également IPAS pour *Inhibitory PAS domain protein*) agit comme un dominant négatif régulateur de l'activité de HIF1a et HIF2a (Gu et al 1998, Makino et al 2001, Yang et al 2015).

B.2. Mais comment les cellules arrivent-elles à détecter les fluctuations du niveau d'oxygène *via* HIF?

Contrairement aux sous-unités β qui sont exprimées de manière constitutive et dont l'expression est insensible aux changements dans les niveaux d'O₂, les sous-unités α subissent des modifications oxygène-dépendantes responsables d'une partie des adaptations cellulaires.

La protéine HIF1a était découverte comme étant rapidement induite en conditions hypoxiques (1% d'O₂) mais également rapidement dégradée suite à une réoxygénation des cellules dans une atmosphère contenant le même niveau d'oxygène que l'air ambiant (21%) (Wang et al 1995). D'ailleurs, le niveau des protéines HIF1a a été démontré comme augmentant de manière exponentielle dans des cellules HeLa au fur et à mesure qu'elles sont exposées à des pressions décroissantes en O₂ (de 6 à 0.5%) avec une réponse maximale entre 1.5 et 2% d'O₂ (Jiang et al 1996). En effet, l'activité transcriptionnelle des complexes HIF nécessite préalablement la stabilisation post-traductionnelle de la sous-unité α . Ceci veut donc dire que même si les niveaux d'ARNm de *hifa* changent en réponse à l'hypoxie, c'est la concentration en oxygène qui détermine la stabilité post-traductionnelle de la protéine.

B.3. Régulation de la protéine HIF α :

La stabilité de la sous-unité HIF α , dont la demi-vie est inférieure à 5 min en des conditions normoxiques (Berra et al 2001), est largement régulée *via* une région contenant 200 acides aminés et appelée ODD (ou ODDD) (pour *Oxygen-Dependant Degradation domain*) (Huang et al 1998). Des études biochimiques ont démontré que cette régulation passait par des réactions impliquant des métabolites et co-facteurs clés (oxygène, 2-oxoglutarate et fer). Ces molécules sont nécessaires à l'hydroxylation des résidus prolines 402 et 564, contenus dans le domaine ODD de HIF1a, par une famille de trois prolyl hydroxylases spécifiques de HIF nommée PHD (*Prolyl Hydroxylase Domain proteins*) (figure 20A) (Brahimi-Horn and Pouyssegur 2007, Ivan et al 2001, Jaakkola et al 2001, Yu et al 2001).

Cette hydroxylation permet par la suite l'ubiquitination de HIF α . Celle-ci est effectuée par la protéine Von Hippel-Lindau (pVHL) contenant une activité ubiquitine ligase E3. Cette ubiquitination initie la reconnaissance de HIF α puis sa dégradation par la sous-unité 26S du protéasome (figure 20A) (Huang et al 1998, Kallio et al 1999, Salceda and Caro 1997). Ce mécanisme est très spécifique car il a été démontré que des cellules du carcinome rénal déficientes pour la pVHL exprimaient de manière constitutive HIF1 α ainsi que de nombreux gènes cibles de HIF (Maxwell et al 1999).

Par ailleurs, une autre hydroxylation permet à HIF α d'interagir avec des co-activateurs transcriptionnels comme p300/CBP (*CREB Binding Protein*) exclusivement en hypoxie. Il s'agit d'une hydroxylation catalysée par le FIH-1 (*Factor Inhibiting HIF-1*) du résidu asparagine 803 présent dans le domaine C-terminal de la protéine HIF α . FIH-1 est également une dioxygénase dont l'activité dépend du fer et du 2-oxoglutarate qui vraisemblablement affine la régulation de HIF suite à des fluctuations en oxygène (Hewitson et al 2002, Lando et al 2002a, Lando et al 2002b, Mahon et al 2001) (figure 20 A).

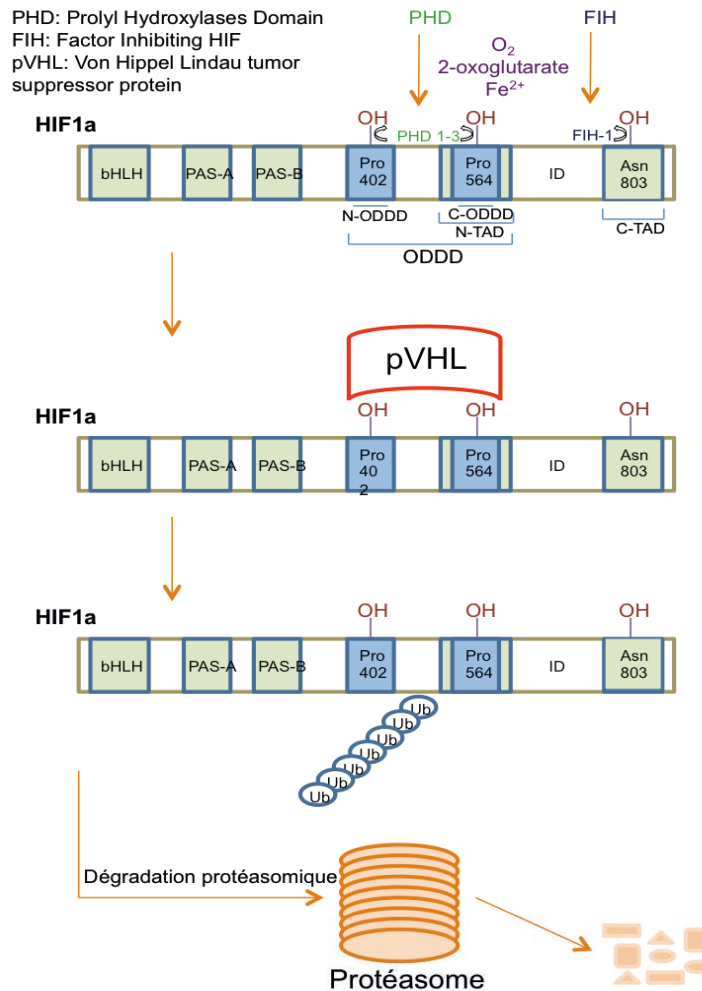


Figure 20 A – régulation des sous-unités de HIF1 en conditions physiologiques.

En conditions physiologiques, les PHD sont actives, hydroxylent HIF1a sur des résidus proline. La protéine est alors reconnue par l'ubiquitine E3 contenant la ligase pVHL qui mène à son ubiquitination et dégradation par le protéasome. En parallèle l'hydroxylation par le FIH sur le résidu asparagine empêche le recrutement des co-facteur de transcription p300/CBP.

Quand le niveau d'oxygène diminue, établissant un gradient hypoxique, l'hydroxylation et la polyubiquitination de HIFa sont donc inhibées et la demi-vie de HIF1a augmente (passant de 5 à 60 minutes) puisque les enzymes dépendantes de l'oxygène (PHD) deviennent progressivement inactives. La protéine HIF1a est alors stabilisée, s'accumule, et se relocalise vers le noyau grâce à un signal de localisation nucléaire présent dans sa région C-terminale (Kallio et al 1998). Une fois dans le noyau, HIF1a et HIF1b dimèrisent et l'ensemble se lie sur les éléments de réponses à l'hypoxie (HRE) au niveau des gènes cibles (figure 20 B). Il est à noter que d'autres mécanismes peuvent mener à une stabilisation de HIF1a : des chélateurs de fer, des analogue du 2-oxoglutarate ainsi que des composés chimiques comme le chlorure de cobalt (CoCl₂) et l'hydralazine (figure 20 B) (Epstein et al 2001, Knowles et al 2004).

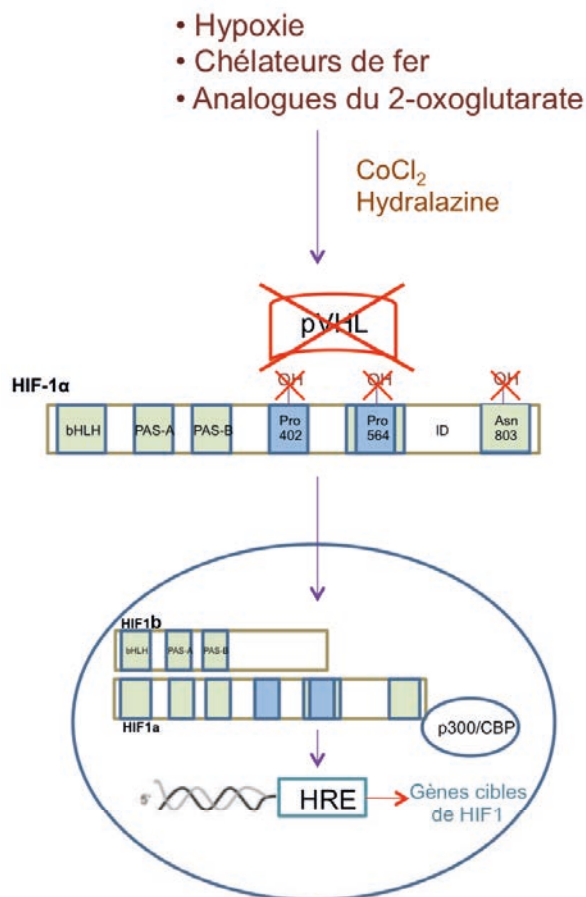


Figure 20 B – régulation des sous-unités de HIF1 en présence et en absence d’éléments inhibant l’action des prolyl hydroxylases (PHD).

En conditions physiologiques, les PHD sont actives, hydroxylent HIF1a sur des résidus proline. La protéine est alors reconnue par l’ubiquitine E3 contenant la ligase pVHL qui mène à son ubiquitination et dégradation par le protéasome. En parallèle l’hydroxylation par le FIH sur le résidu asparagine empêche le recrutement du co-facteur de transcription p300. En conditions hypoxiques ou en présence de chélateurs de Fer ou d’analogues du 2-oxoglutarate, tous ces processus sont inhibés, HIF1a est stabilisé, migre vers le noyaux et dimérise avec HIF1b. Ce couple recrute alors p300/CBP, se lie sur les régions HRE des gènes cibles et mène à leur régulation.

B.4. Adaptations cellulaires à l’hypoxie :

HIF est impliqué dans la régulation de plus de 40 gènes cibles. L’expression ou la répression de ces gènes mènent à la régulation de la respiration, l’érythropoïèse, l’angiogenèse, l’homéostasie, l’autophagie, la migration, la régulation vasomotrice, mais également le métabolisme glycolytique (capture du glucose, glycolyse, fermentation lactique et inhibition de la respiration mitochondriale). C’est ainsi que les cellules hypoxiques arrivent à survivre et à s’adapter à leur environnement faible en oxygène (Semenza 2002).

Le métabolisme énergétique aérobie est dépendant sur la phosphorylation oxydative et la baisse dans les niveaux d'O₂ perturbe la production d'ATP et la viabilité cellulaire. De ce fait, en réponse à l'hypoxie, les cellules subissent des changements adaptatifs qui leur permettent de survivre et de proliférer.

D'une part, les cellules hypoxiques vont libérer des facteurs angiogènes stimulant ainsi la vascularisation *de novo* dans le but de restaurer le manque en oxygène et en nutriments subvenant ainsi aux demandes métaboliques des cellules en prolifération. L'hypoxie exerce donc une pression sélective sur les cellules capables d'augmenter leur activité angiogénique alors que les cellules incapables de garantir un approvisionnement adéquat en oxygène et en nutriments vont vraisemblablement devenir nécrotiques (Jiang et al 1997, Maxwell et al 1997).

D'autre part, ces cellules subissent un *switch* glycolytique évident, passant d'un métabolisme aérobie à anaérobie (également appelé 'effet Warburg'), ce qui permet le maintien des activités métaboliques sous des conditions de disponibilité en oxygène limitée (Pani et al 2010, Taddei et al 2013). Cependant, comme le *switch* à un métabolisme anaérobie est insuffisant pour satisfaire tous les besoins énergétiques, des adaptations additionnelles sont requises. Par exemple, les réponses cellulaires adaptatives impliquent l'expression coordonnée de plusieurs gènes comme entre autre ceux codant les transporteurs du glucose (GLUT1 et 3), les enzymes glycolytiques (Phosphoglycerate kinase I, pyruvate kinase M, hexokinase II), VEGF, EPO ou encore HO-1 (*Heme-Oxygenase-1*) (Semenza 2003).

Ces adaptations concernent toutes les cellules exposées à l'hypoxie et doivent être rapides et transitoires. Néanmoins, dans un cadre tumoral, les cellules sont privées d'oxygène et de nutriments pour des périodes plus longues et ces adaptations leur permettent non seulement de survivre dans ce nouveau microenvironnement devenu hostile mais également d'acquérir de nouvelles propriétés leur permettant d'en échapper.

C. L'hypoxie tumorale :

C.1. Le microenvironnement tumoral :

C.1.1. Généralités :

Le concept pendant longtemps admis qui proposait que les cellules cancéreuses dans les tumeurs solides agissaient indépendamment de leur tissu environnant et de leur microenvironnement a drastiquement changé au cours de ces deux dernières décennies (Hanahan and Weinberg 2011). Les tumeurs sont maintenant reconnues comme des tissus complexes avec une forte contribution du microenvironnement pour l'acquisition d'un phénotype malin ainsi que l'infiltration, la croissance et la métastase tumorales (Bremnes et al 2011, Hanahan and Weinberg 2011, Pietras and Ostman 2010).

C.1.2. Définition :

Le stroma tumoral est formé de toutes les cellules qui entourent la tumeur. Ceci inclut les fibroblastes, myofibroblastes, cellules inflammatoires, cellules souches mésenchymateuses, adipocytes, cellules endothéliales, péricytes et la matrice extracellulaire (Madar et al 2013).

Les cellules cancéreuses sont capables de produire des facteurs de croissance qui modulent le stroma. Ceux-ci peuvent perturber l'homéostasie tissulaire et créer un microenvironnement cancéreux « propice » (Pietras and Ostman 2010). En effet, de manière paracrine, ces facteurs de croissance induisent l'angiogenèse et les réponses inflammatoires en activant des cellules stromales, qui en retour peuvent se comporter de manière pro-tumorigénique (Mueller and Fusenig 2004).

C.1.3. Les cellules immunitaires :

Les cellules immunitaires du microenvironnement comprennent à la fois des cellules immunitaires innées (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques..) et

adaptatives (lymphocytes B et T). Les cellules immunitaires, tout comme les fibroblastes associés au cancer (CAF) (ou la version actuelle « *CAF state* » qui définit les cellules dans le stroma tumoral avec une apparence mésenchymateuse et une habilité à promouvoir la tumorigenèse (Madar et al 2013)) communiquent avec les cellules cancéreuses de manière directe (contact) ou indirecte (production de cytokines et de chimiokines). Durant la tumorigenèse, il semblerait que l'immunité anti-tumorale et l'inflammation pro-tumorale coexistent. Ce qui va décider dans quelle direction la balance va pencher est l'expression de nombreux facteurs ainsi que l'activation et l'abondance de différentes cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral (Grivennikov et al 2010). De ce fait, le microenvironnement, de part la diversité de ces composants et des approches possibles, pourrait présenter des cibles thérapeutiques intéressantes.

C.2. L'hypoxie et le cancer :

C.2.1. Généralités :

Afin d'assurer leurs fonctions, leur développement et leur prolifération, les cellules ont besoin d'approvisionnement continu en nutriments (sources de carbone, d'azote et d'oxygène moléculaire). Ces provisions sont nécessaires pour optimiser le catabolisme cellulaire *via* la respiration (génération d'énergie en matière d'ATP, anabolisme et maintien du potentiel redox intracellulaire pour la prise en charge des dérivés réactifs de l'oxygène). Dans des conditions tumorales, et malgré le fait que certaines tumeurs aient acquis l'habilité à promouvoir le développement de leurs propres vaisseaux sanguins lors de leur croissance, elles croissent plus rapidement que les cellules endothéliales. Ceci mène à une insuffisance d'irrigation des tissus et donc à un déficit en oxygène et en nutriments (Wilson and Hay 2011). Des zones hypoxiques sont donc fréquemment retrouvées dans les tumeurs solides.

C.2.2. Présence de zones hypoxiques au sein des tumeurs :

En effet, il a été décrit que certaines régions dans les tumeurs solides expérimentent de faibles à sévères déprivations en oxygène. Il a également été bien documenté que cette oxygénation pauvre des cellules est une propriété

physiopathologique de la majorité des tumeurs solides humaines (Brown 1999). Cette hypoxie intratumorale initie des réponses biologiques complexes impliquant une pléthore de voies de signalisation intracellulaires qui influencent les propriétés des tumeurs allant de la prolifération et l'induction de la mort cellulaire à l'angiogenèse, la progression métastatique voire la sélection de cellules avec des phénotypes plus agressifs (Bertout et al 2008, Wouters et al 2007).

Ces processus liés à la biologie et la physiologie tumorales sont en réalité paradoxalement influencés par l'hypoxie par deux manières opposées : d'un côté, le manque d'oxygène en tant que tel peut induire une réponse au stress et déclencher la mort des cellules, et d'un autre côté, l'hypoxie induit un large éventail de réponses adaptatives qui favorise leur survie. Par conséquent, l'hypoxie a été démontrée à maintes reprises comme étant de mauvais pronostic dans une grande variété de tumeurs. De plus, des expériences à la fois cliniques et fondamentales ont montré que l'hypoxie jouait un rôle primordial dans la progression tumorale (Vaupel and Mayer 2007).

C.2.3. Rôle des HIFs dans le cancer :

Comme précédemment décrit, le marqueur spécifique et reconnu de l'hypoxie est l'augmentation drastique dans la cellule du niveau protéique des HIFs. En se basant sur des analyses de biopsies de cancers humains et de modèles expérimentaux chez l'animal, il devient de plus en plus clair que les HIFs jouent un rôle critique dans la progression cancéreuse (figure 21) (Giaccia et al 2003, Maxwell et al 2001, Semenza 2003). Des études immunohistochimiques ont démontré que HIF1a est surexprimé dans un large spectre de pathologies humaines malignes (Semenza 2003). Par ailleurs, l'accumulation de HIF1a a été associée avec un mauvais pronostic de survie dans les phases précoces des cancers cervicaux (Birner et al 2000), du sein (Schindl et al 2002), ovariens (Birner et al 2001), endométriaux (Sivridis et al 2002) et les carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx (Aebbersold et al 2001) alors que, de manière surprenante, elle a été associée avec une baisse de mortalité dans les cancers des voies aérodigestives supérieures (cancers de la tête et du cou) (Beasley et al 2002) et les cancers pulmonaires non à petites cellules (Volm and Koomagi 2000). A noter que

l'accumulation de HIF2a dans ces deux types de cancer a en revanche été associée avec une plus forte mortalité (Giatromanolaki et al 2001, Koukourakis et al 2002) ce qui suggère que ces deux sous-unités de HIFa peuvent avoir des effets opposés sur la progression de la maladie en fonction du type tumoral. Une autre différence a également été mise en évidence entre ces deux sous-unités chez des patients avec une maladie de von Hippel-Lindau et qui développent des carcinomes rénaux. En effet, au fur et à mesure du développement de cette maladie, l'expression de HIF1a diminue graduellement alors que celle de HIF2a augmente. D'ailleurs, une inhibition de HIF1a a mené à une augmentation de la masse tumorale alors que l'inhibition de HIF2a a résulté en une baisse de la croissance tumorale, confirmant ainsi l'effet opposé de ces deux sous-unités vraisemblablement dépendant du tissu (Mandriota et al 2002, Raval et al 2005). Par ailleurs, HIF1a a été décrit comme s'opposant à l'effet de c-Myc (un régulateur puissant de la prolifération et le métabolisme anabolique) (Koshiji et al 2004) alors que HIF2a promeut son activité (Gordan et al 2007).

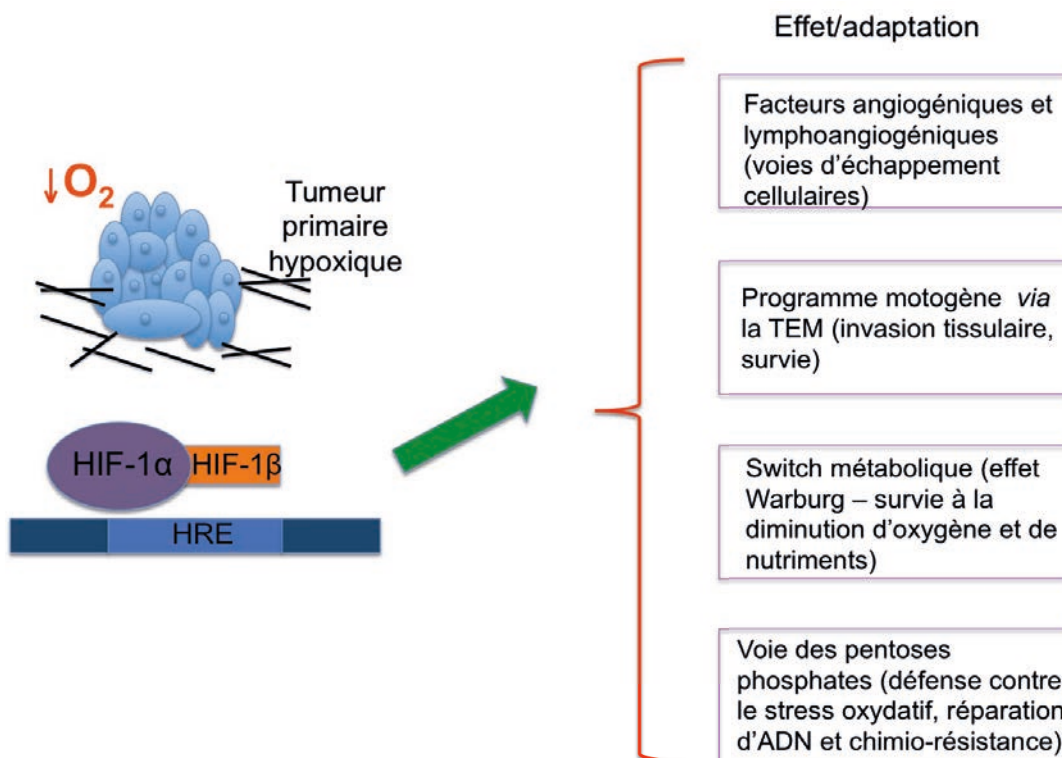


Figure 21 – Adaptations cellulaires induites par l'hypoxie tumorale. Inspiré de (Taddei et al 2013).

Au sein des tumeurs, le déficit en apport sanguin mène à une déficience en oxygène et en nutriments. Il s'ensuit une activation d'un grand nombre de gènes par l'intermédiaire du facteur de transcription HIF1 qui se fixe au niveau des gènes sur les éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) menant à l'adaptation de la cellule à son nouvel environnement. TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse.

C.2.4. Autres mécanismes menant à l'augmentation transcriptionnelle de HIF :

A noter que l'hypoxie n'est pas le seul paramètre pouvant augmenter l'activité transcriptionnelle de HIF. Une activation oncogénique ou une perte de gènes suppresseurs de tumeurs comme *p53*, *pten* ou *vhl* peuvent avoir cet effet. En effet, une étude a démontré que la déprivation en O₂ menait à une pression sélective intratumorale pour une expansion clonale des rares cellules qui ont acquis les mutations *p53*. Egalement, plusieurs voies de signalisation contribuent à la régulation de la transcription de gènes dépendante de l'hypoxie. Certaines incluent les voies RAS/ERK, MAPK, PI3K, mTOR ainsi que des signalisations *via* les espèces réactives de l'oxygène (ROS) mitochondriaux (Brader and Eccles 2004, Richard et al 1999, Seta et al 2002, Simon 2006). Par ailleurs, des facteurs de croissance, hormones et cytokines produits par les cellules tumorales et stromales peuvent également mener à une augmentation de la traduction de la protéine HIF1a. Par exemple, l'activation de la PI3K peut mener à l'augmentation de HIF1a par l'activation de la protéine S6 ribosomale (Dery et al 2005, Graeber et al 1996, Semenza 2002, Semenza 2003).

C.3. L'acidité du milieu extracellulaire :

Comme cité précédemment, une des adaptations cellulaires à l'hypoxie est l'établissement d'un *switch* métabolique. Néanmoins, les produits résultants de ce *switch* provoquent une acidification de l'espace extracellulaire et la toxicité cellulaire résultante agit comme une pression sélective supplémentaire pour les cellules qui sont résistantes aux conditions acides. En effet, les cellules capables de subir ces adaptations possèdent un avantage de survie puisqu'elles sont capables de maintenir la production d'ATP et d'altérer l'environnement local d'une manière sélectivement néfaste pour les populations compétitrices (Gatenby and Gillies 2004, Sullivan and Graham 2007).

Il existe deux facteurs toujours fortement associés avec la malignité, indépendamment des mutations d'oncogènes : le pH acide et le déficit en oxygène. Le déficit en oxygène a été discuté précédemment. Concernant le pH, sa dérégulation est une réponse adaptative dans la plupart des cancers. En effet, les cellules normales ont

un pH intracellulaire (pHi) généralement aux alentours de 7.2, et un pH extracellulaire (pHe) aux alentours de 7.4, alors que les cellules cancéreuses montrent un gradient de pH 'inversé' avec un pHi plus élevé (> 7.4) et un pHe plus faible (entre 6.7 et 7.1) (Webb et al 2011).

Néanmoins, étant donné que beaucoup de processus intracellulaires requièrent un pH optimum très étroit, le maintien du pH intracellulaire est crucial pour le fonctionnement des cellules. Par conséquent, les cellules tumorales ont développé des stratégies pour réguler leur pHi, ce qui, par la suite, protège leur cytosol de l'acidose et leur permet de survivre à l'hypoxie. Par exemple, sous des conditions hypoxiques, l'activation de la transcription de HIF1 permet de réguler la sortie des protons et l'homéostasie du pH en augmentant l'expression des pompes ioniques et des transporteurs membranaires (Brahimi-Horn et al 2011, Cardone et al 2005). Les systèmes de régulation du pHi des cellules cancéreuses les plus notables sont : les échangeurs Na^+/H^+ (NHE-1 - *Sodium/Hydrogen Exchanger*), les transporteurs de monocarboxylates (MCT - *Monocarboxylate Transporteur*) et les transporteurs de bicarbonates (figure 22) (Taddei et al 2013).

Une autre contribution à l'alcalinisation intracellulaire provient d'une famille de protéines appelée les Anhydrases Carboniques (CA) dont certaines possèdent des domaines catalytiques extracellulaires qui accélèrent l'hydratation du CO_2 extracellulaire en HCO_3^- et H^+ . En particulier, l'expression des isoformes CAIX et CAXII est substantiellement augmentée sous des conditions hypoxiques de manière HIF1 dépendante (figure 22) (Chiche et al 2010a, Chiche et al 2010b).

De manière complémentaire, comme observé dans le cas du cancer du sein, un pHe acide mène à une redistribution significative des lysosomes de la région péri-nucléaire à la périphérie cellulaire. Ceci pourrait être un mécanisme facilitant l'augmentation de la sécrétion des enzymes de dégradation, comme la cathépsine B, permettant le clivage des métalloprotéases matricielles (MMP) sécrétées et latentes en des enzymes actives (Giusti et al 2008, Glunde et al 2003) (figure 22). En effet, le pH bas du microenvironnement tumoral pourrait promouvoir la dégradation et le remodelage

de la MEC par l'activation des enzymes protéolytiques comme les MMP et les sérines protéases.

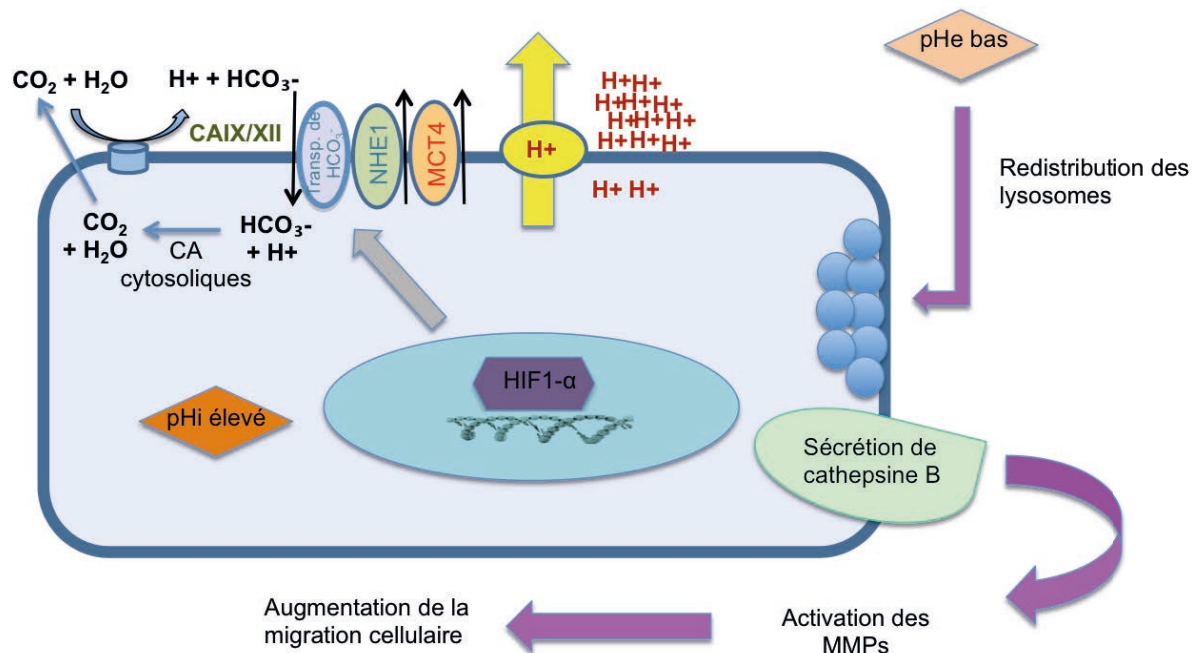


Figure 22 – Le gradient de pH régule la migration de la cellule cancéreuse (Taddei et al 2013).

L'établissement d'un milieu tumoral hypoxique et l'adaptation métabolique des cellules cancéreuses qui en résulte provoque un changement dans le gradient de pH des cellules. En particulier, sous des conditions hypoxiques, l'activation de HIF-1 régule la sortie des protons et l'homéostasie du pH en augmentant l'expression des transporteurs et pompes ioniques (NHE-1, MCTs, transporteurs de bicarbonates) ainsi que celle de CAIX et CAXII qui accélèrent l'hydratation du CO₂ extracellulaire en HCO₃⁻ et H⁺. Tout cela contribue à instaurer un pH 'inversé' (augmentation du pHi et diminution du pHe). Un pHe bas va provoquer une redistribution des lysosomes vers la surface cellulaire et la sécrétion d'enzymes de dégradation et donc l'activation des métalloprotéases (tels que MMP3 et MMP9).

C.4. L'hypoxie et la métastase cancéreuse :

Le rôle de l'hypoxie a également été investigué dans les processus d'initiation, progression et métastases tumorales. La métastase représente le stade final et le plus dévastateur d'une maladie maligne ainsi que la cause principale de la mort par le cancer. C'est un processus complexe à plusieurs étapes et impliquant une série d'interactions tumeur-hôte. Des preuves expérimentales ont démontré que l'exposition à l'hypoxie augmentait l'invasion tumorale *in vitro* et le potentiel métastatique *in vivo* (Cairns et al 2001, Postovit et al 2002).

C.4.1. Première étape : la transition épithélio-mésenchymateuse

L'étape initiale de la métastase implique l'interruption de l'adhésion de la cellule avec les cellules environnantes et l'acquisition d'un phénotype de motilité, processus appelé transition épithélio-mésenchymateuse (EMT pour *Epithelial-Mesenchymal Transition*). Un composant important des jonctions d'adhésion, la *Epithelial* (E)-cadhérine, agit comme un suppresseur de l'invasion et de la métastase (Graff et al 2000). Il a été démontré que l'hypoxie ainsi que des délétions de *vhl* (dans le cancer du rein) sont associées à une perte concomitante de la E-cadhérine. Son expression a également été retrouvée de manière inversement proportionnelle à celle de HIF1a dans des étapes avancées du cancer de l'ovaire (Imai et al 2003, Krishnamachary et al 2006).

C.4.2. Seconde étape : l'invasion

La seconde étape du processus métastatique implique la migration au travers de la matrice extracellulaire. Celle-ci nécessite une augmentation de l'activité protéolytique et de la motilité pour que les cellules puissent atteindre la microcirculation sanguine ou lymphatique. L'enzyme protéolytique uPA est activée suite à sa liaison avec son récepteur uPAR et convertit le plasminogène en plasmine. Cette dernière est impliquée dans la dégradation de nombreuses protéines de la MEC (comme la fibronectine et la laminine) de manière directe ou après activation des MMP qui par la suite vont contribuer à la dégradation de la MEC (Behrendt 2004). Il a été démontré que le gène *upar* est un gène cible de la réponse à l'hypoxie. En effet, celle-ci augmente l'invasion *in vitro* des cellules de carcinomes mammaires mais cet effet est bloqué en utilisant des anticorps anti-uPAR (Graham et al 1999). Cet effet a par ailleurs été démontré dans d'autres types de cancers (côlon, prostate, mélanomes) (Sullivan and Graham 2007).

C.4.3. Troisième étape : l'intravasation

Par la suite, la dissémination métastatique implique la pénétration des parois vasculaires (intravasation) et la survie dans le système vasculaire (entre autres, la résistance à l'anoïkose et l'échappement à l'immunité de l'hôte). L'hypoxie induit une augmentation de l'expression du VEGF qui résulte en une augmentation de l'angiogénèse

et la lympho-angiogenèse. Par ailleurs, le VEGF renforce également la propagation métastatique et promeut l'intravasation en augmentant la perméabilité vasculaire et en contribuant à l'élévation de la pression du liquide interstitiel (*Interstitial Fluid Pressure* IFP) (Dvorak et al 1999, Rofstad et al 2002).

C.4.4. Dernière étape : l'extravasation

Finally, pour former des métastases, les cellules doivent sortir de la circulation (extravasation) et initier l'angiogenèse pour supporter la croissance tumorale et la colonisation du tissu cible. Le rôle du VEGF a encore une fois été établi dans ce cas. En effet, une inhibition directe de son activité par des anticorps anti-VEGF a montré une suppression de l'extravasation et des métastases pulmonaires (Melnik et al 1996, Rofstad and Danielsen 1999, Weis et al 2004).

Par ailleurs, dans deux études distinctes de 2007, la déficience en HIF1a dans le cancer du sein a mené à un retard dans l'apparition de la tumeur, à une réduction de la croissance tumorale, à une diminution des vaisseaux sanguins et à une diminution du nombre de métastases pulmonaires. Ceci témoigne du rôle de HIF1a dans la promotion du potentiel métastatique (Hiraga et al 2007, Liao et al 2007).

De ce fait, il est clairement établi que l'hypoxie favorise chaque étape de la métastase cancéreuse et promeut la propagation tumorale.

D. L'hypoxie et les enjeux thérapeutiques :

L'hypoxie est corrélée, d'une part, à un état de stress oxydatif et, d'autre part, à l'augmentation de la résistance aux thérapies anticancéreuses dans de nombreux modèles cancéreux (Brahimi-Horn et al 2011). De ce fait, le clonage de HIF, la compréhension des voies qui le régulent et l'identification de ses cibles en aval ont produit un grand nombre de cibles moléculaires en thérapie. En particulier, vu le rôle de l'hypoxie dans les processus tumorigéniques, le ciblage de la voie des HIFs est d'autant plus important que cette approche permet de cibler de manière sélective les cellules tumorales hypoxiques.

D.1. L'hypoxie et la chimiorésistance :

Les effets biologiques de l'hypoxie sur les cellules tumorales peuvent aussi moduler leurs réponses aux thérapies. D'une manière générale, l'hypoxie module différentes voies qui contribuent à la radio et la chimio résistance. Par exemple, elle exerce une pression sélective sur les cellules pour la perte de p53, médiateur clé de l'apoptose, et augmente l'expression génique de *mdr1* (*multidrug resistance*) menant à l'efflux des drogues chimiothérapeutiques (Comerford et al 2002, Graeber et al 1996, Wartenberg et al 2003). Par ailleurs, et *via* la régulation de certains gènes comme *lysyl oxidase*, *met* et *cxcr4*, l'hypoxie mène à l'augmentation du taux de métastases (Erler et al 2006, Pennacchietti et al 2003, Staller et al 2003). De ce fait, l'échec de certaines thérapies anti-angiogéniques dans la prévention de l'apparition de métastases pourrait être dû à ces adaptations favorisées par l'hypoxie au sein des cellules cancéreuses (Chiche et al 2010a).

D.2. L'hypoxie et la radiorésistance :

Les premières études sur le rôle des niveaux d'oxygène ont été bâties sur l'observation que les tissus pauvrement perfusés sont plus résistants à la radiation. De ce fait, une connexion directe a été faite entre l'oxygénation tissulaire et la résistance tumorale, l'oxygène agissant comme un radiosensibilisateur et augmentant le dommage de l'ADN *via* la formation de radicaux libres (Brown 2007, Gray et al 1953). De ce fait, l'utilisation de nouvelles méthodes de traitement par radiations sont actuellement en cours comme le dose-painting. Il s'agit en effet de prescrire des doses non uniformes de radiations en fonction de la zone cible. Ces doses sont établies en se basant sur des biomarqueurs moléculaires ou d'imagerie indiquant les risques locaux de rechute comme par exemple au niveau des zones hypoxiques (Alonzi 2015, Bentzen and Gregoire 2011).

D.3. Ciblage de HIF1 et de ses gènes cibles :

Etant donné son rôle central, le ciblage de HIF attire une attention tout à fait particulière. Cependant, vu la difficulté de cibler directement les facteurs de transcription, les stratégies les plus prometteuses s'orientent vers le blocage de l'accumulation de HIF, soit par l'inhibition de la traduction soit en promouvant sa dégradation. Une autre approche consiste en une inhibition des gènes cibles de HIF comme le *vegf*, *tgfa* ou *lysyl oxidase*. En effet, des thérapies dirigées contre des cibles clés de HIF ont été développées et approuvées pour une utilisation clinique. Parmi ces molécules se trouvent le bevacizumab (Avastin®), un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF, communément utilisé dans le traitement du cancer colorectal métastatique mais également le sorafenib, inhibiteur du VEGFR qui a montré un bénéfice clinique dans les carcinomes hépatocellulaires et rénaux (Escudier et al 2007, Ferrara et al 2004, Hurwitz et al 2004).

En outre, le ciblage de l'interaction entre HIF et le co-activateur transcriptionnel p300 a également mené à l'inhibition de l'expression de gènes cibles de HIF et à la réduction de la croissance tumorale (Kung et al 2000, Kung et al 2004). Egalement, et même si les mécanismes ne sont pas encore clairs, un grand nombre d'autres petites molécules comme les inhibiteurs de topoisomérase, les déstabilisateurs de microtubules ou les inhibiteurs d'histone désacétylase inhibent l'accumulation de HIF1a (Semenza 2007).

Par ailleurs, comme décrit précédemment, des mutations dans les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAS ont été montrées comme régulant positivement la protéine HIF1a. En effet, l'inhibition de mTOR, dans des modèles de cancer de la prostate chez la souris ou avec des cellules cancéreuses rénales, a diminué l'accumulation de HIF1a et l'expression de gènes dépendants de HIF (Majumder et al 2004, Thomas et al 2006).

De ce fait, près d'un siècle après la découverte initiale de Warburg du métabolisme tumoral, les *crosstalk* entre les voies de HIF ainsi que les dérégulations des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs qui conduisent aux changements

métaboliques reste un domaine majeur d'étude. Prises ensemble, ces observations seraient critiques pour le développement réussi de nouveaux traitements avec la promesse d'amélioration des thérapies ciblées utilisées dans le cancer et l'abolition des résistances induites par l'hypoxie.

E. L'hypoxie et les RTK :

De nombreux RTK et leurs ligands sont régulés en conditions hypoxiques soit directement par HIF1a ou HIF2a ou par d'autres mécanismes dépendants de l'hypoxie, mais indépendants des HIFs (figure 23).

E.1. Les ligands des RTK :

E.1.1. La famille du VEGF :

La baisse de pression en oxygène a été corrélée avec une production plus élevée de plusieurs ligands des RTK. Par exemple, il a été démontré que l'expression du VEGF-A est induite par l'hypoxie dans de nombreux types cellulaires à la fois *in vitro* et *in vivo* (figure 23) (Ferrara and Davis-Smyth 1997, Harris 2002). L'augmentation de la sécrétion des membres de la famille VEGF par les cellules tumorales hypoxiques peut être de manière paracrine (menant à la prolifération et la migration des cellules épithéliales) ou de manière autocrine en tant que facteurs de survie pour les cellules tumorales elles mêmes (Mercurio et al 2004, Simiantonaki et al 2008). Elle peut également se faire par des mécanismes additionnels comme l'augmentation de l'activité kinase de Src dans les cellules de gliome (Mukhopadhyay et al 1995).

E.1.2. Le PDGF et l'IGF :

L'augmentation de la production des VEGFs est également due à une dérégulation de la production de PDGF médié par HIF (Abdel-Rahman 2015). En effet, l'hypoxie induit la transcription du *pdgfb* et plusieurs études ont rapporté une corrélation entre l'expression de HIF1a et PDGFb dans le cancer du sein (figure 23) (Schito et al 2012). D'autre part, le IGF2, ligand du récepteur tyrosine kinase IGF1R joue également un rôle

dans la tumorigenèse induite par l'hypoxie est induit par l'hypoxie dans des cellules issues de carcinome hépatocellulaire (HepG2) (figure 23) (Kim et al 1998).

E.1.3. Le TGF :

Nous avons vu précédemment que la surexpression de HIF1a/HIF2a peut également avoir lieu dans des conditions non-hypoxiques, comme par exemple dans le cas des cellules *vhl* *-/-* issues de cancers du rein. Il a été démontré que la croissance dérégulée de ces cellules était liée à une activation de la voie TGFa/EGFR. Par ailleurs, cette étude a montré que la surproduction de TGFa par ces cellules était une conséquence directe de l'activation de HIF (figure 23) (Gunaratnam et al 2003). En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de l'EGFR a été aussi efficace que la réintroduction de VHL dans l'abolition de l'habilité de ces cellules à former des tumeurs dans des souris *nude* (Ciardiello et al 1998, Iliopoulos et al 1995).

E.2. Les RTK :

E.2.1. La famille de l'EGFR :

Indépendamment de l'activation transcriptionnelle induite directement par HIF1a/HIF2a, l'hypoxie a un impact très fort sur les membres de la famille des ErbB consistant en EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 et HER4/ErbB4 et dont l'activation aberrante par la famille des EGF est fortement associée avec la tumorigenèse, l'invasion et la métastase (Momose et al 2013). La dérégulation de leur activité à cause d'une amplification génique, surexpression ou mutations dans de nombreux types cellulaires issus de cancers humains est étroitement associée avec un mauvais pronostic et une résistance à différents traitements (Yarden and Sliwkowski 2001).

L'expression de l'EGFR corrèle avec l'hypoxie tumorale dans le cancer du poumon non à petites cellules. En effet, l'hypoxie et l'activation de HIF2a ont été spécifiquement montrées comme induisant la surexpression de l'EGFR dans ces cellules (Swinson and O'Byrne 2006). Par ailleurs, la régulation positive de l'EGFR peut être court-circuitée en

inhibant HIF2a en utilisant l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II (Wang and Schneider 2010). De plus, l'activation par l'hypoxie de HIF1a et HIF2a prolonge la signalisation de EGFR et de HER4 dans les cancers rénaux et les carcinomes mammaires respectivement (figure 23) (Paatero et al 2014, Wang et al 2009b). Il a également été démontré que l'hypoxie augmentait la signalisation de HER2 et HER3 dans des cellules du cancer du côlon (Momose et al 2013).

E.2.2. Les autres RTK :

E.2.2.a. L'IGFR :

Par ailleurs, l'hypoxie a montré qu'elle induisait une augmentation de la population de cellules souches cancéreuses résistantes au géfitinib en activant un autre RTK qui est l'IGF1R. En effet, il a été démontré que dans des cellules du cancer du poumon non à petites cellules avec mutation de l'EGFR, l'hypoxie augmentait le nombre de sphères des cellules souches cancéreuses du poumon résistantes au géfitinib par l'augmentation de l'IGF1 et l'activation de l'IGF1R. Ce résultat fait de ce dernier une cible intéressante pour surmonter la résistance au géfitinib des tumeurs avec des mutations activatrices de l'EGFR (Murakami et al 2014).

E.2.2.b. Le FGFR3 :

D'autre part, l'hypoxie augmente les niveaux de mRNA du FGFR3 par l'intermédiaire de la répression de miR-100 connu pour cibler le FGFR3 (figure 23). Par ailleurs, HIF1a semble également jouer un rôle dans la régulation négative de ce miRNA vu que son *knockdown* diminue les niveaux de FGFR3 dans des conditions hypoxiques. Néanmoins, les mécanismes moléculaires menant à ce résultat ne sont pas encore connus (Blick et al 2013).

E.2.2.c. RON et AXL :

Le récepteur RON, connu pour interagir avec MET est également activé en hypoxie suite à la liaison de HIF1a sur les deux HRE situés sur son promoteur (figure 23)

(Follenzi et al 2000, Thangasamy et al 2009). Par ailleurs, l'hypoxie augmente également dans les cellules du cancer du rein, *via* HIF1a et HIF2a, l'expression de AXL, un autre RTK par ailleurs décrit comme un médiateur important de l'invasion tumorale et de la métastase dans de nombreux types de cancers. En effet, AXL régule l'activation de MET par l'intermédiaire l'activation de Src, qui mène à la phosphorylation de MET (Rankin et al 2014).

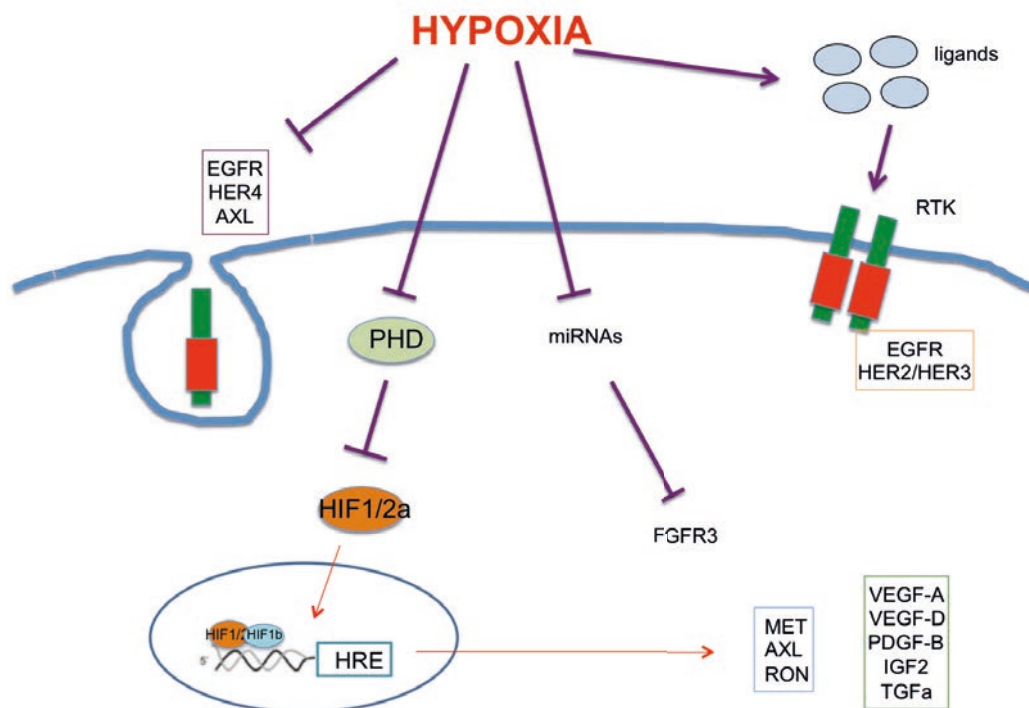


Figure 23 – Activation des RTK de manière dépendante de l'hypoxie. Tiré de (Gluck et al 2015).

L'hypoxie induit l'activation des RTK de différentes manières. En effet, elle induit la surexpression de certains ligands comme le VEGF-A et D, le PDGF-B, l'IGF2 et ou le TGFa. Elle induit également la surexpression de certains RTK comme MET, RON ou AXL suite à une stabilisation de HIF1a. Par ailleurs, elle augmente l'expression du FGFR3 par l'inhibition du mi-R100, connu pour cibler ce RTK.

L'un des récepteurs les plus décrits comme étant régulé par l'hypoxie est le récepteur MET qui va être discuté dans le chapitre suivant.

F. L'hypoxie et la signalisation HGF/SF-MET :

Comme décrit dans le chapitre I, le récepteur MET et son ligand de haute affinité, le HGF/SF, sont fortement impliqués dans de nombreux phénomènes physiologiques et

pathologiques. La régulation croisée entre MET et l'hypoxie a été décrite pour la première fois par une équipe italienne menée par le Pr. Comoglio il y a un peu plus de 10 ans. Cette étude a démontré une régulation de MET par l'hypoxie *in vitro* et *in vivo*. Il a notamment été observé *in vitro* une augmentation des niveaux de mRNA et de protéines de MET dans un certain nombre de lignées cancéreuses après exposition à l'hypoxie menant à une augmentation de l'invasion et de la motilité cellulaires. *In vivo*, cette équipe a observé une expression protéique de MET inversement proportionnelle avec le niveau d'oxygène. Cette induction a été démontrée comme étant d'origine transcriptionnelle et médiée, sur le gène de *met*, par deux différents sites de liaisons de HIF1a et un site de liaison de AP-1 (un autre facteur de transcription), tous situés au niveau de la région de l'ADN qui correspondra dans l'ARNm à la région 5' non traduite (5' UTR) (Pennacchietti et al 2003).

L'augmentation de l'expression de MET favorise à elle seule l'oligomérisation du récepteur et son activation par le ligand ainsi qu'une augmentation de la sensibilité et la susceptibilité des cellules à la stimulation par l'HGF/SF (Michieli 2009, Pennacchietti et al 2003). Ce dernier effet, lié à une augmentation du niveau d'HGF/SF, pourrait être expliqué par l'augmentation en hypoxie de l'activité de certaines protéases comme uPA (Graham et al 1998, Naldini et al 1992). Par la suite, Ide et *al.* ont démontré une augmentation de l'invasion des PK8, cellules cancéreuses pancréatiques, incubées avec du milieu hypoxique de fibroblastes (MRC5). Cette invasion plus élevée est due à une augmentation de l'expression de MET dans les PK8 et une augmentation de la sécrétion de l'HGF/SF par les fibroblastes (Ide et al 2006).

Par ailleurs, il a été décrit que la première stratégie des cellules pour échapper à un microenvironnement tumoral défavorable, comme l'hypoxie, est l'activation d'un programme de motogénie et le premier facteur engagé est le couple HGF/SF-MET (Pennacchietti et al 2003). En favorisant la dégradation de la MEC par les MMP, l'hypoxie déclenche la EMT conduisant ainsi à la motilité cellulaire. En altérant l'expression, la localisation et l'activité des cadhérines, intégrines et MMP, la signalisation HGF/SF-MET est un acteur actif de ce phénomène (Sullivan and Graham 2007, Taddei et al 2013, Trusolino and Comoglio 2002).

Dernièrement, et dans des cellules cancéreuses rénales, une étude a montré d'une part, que l'hypoxie menait à une diminution de l'expression de la phosphatase DUSP2 par les ROS. Cet effet mène à une augmentation de la voie MAPK/ERK et à une augmentation du caractère invasif des cellules. D'autre part, l'hypoxie augmenterait l'activation de la *Protein Kinase C* (PKC) ainsi que celle de la *Protein Phosphatase-2A* (PP2A) ce qui induirait une diminution de l'activation de la voie AKT, menant à une diminution de la prolifération et à l'induction de l'autophagie (Lee et al 2014).

A noter qu'il a été démontré que l'activation de l'EGFR, que ce soit par des mutations activatrices ou suite à une liaison de son ligand, a mené à une amplification génique de MET dans le cancer pulmonaire non à petites cellules. Cette amplification est HIF1a-dépendante et mène à une augmentation de l'expression de MET ainsi que l'invasion cellulaire (Xu et al 2010).

➤ ***MET, HIF1a et leurs régulations croisées :***

Nous savons que MET est régulé par HIF1a, mais l'inverse est également vrai. En effet, l'activité de MET induite par l'HGF/SF dans les cellules d'hépatome augmenterait le niveau de mRNA et de protéines de HIF1a ainsi que l'augmentation de son activité et l'expression de ses gènes cibles (Tacchini et al 2001). Dans différentes lignées cellulaires cancéreuses, il a été démontré que l'activation de MET par l'HGF/SF mène à l'activation de NF- κ B qui est capable de réguler l'expression de HIF1a par sa liaison sur la région 5' UTR du mRNA de ce dernier (Tacchini et al 2004). Par ailleurs, l'inhibition de la signalisation HGF/SF-MET par utilisation de la décorine, un protéoglycane riche en leucines impliqué dans la dégradation de MET, a montré une réduction de l'expression de HIF1a et du VEGF-A dans des cellules du carcinome mammaire (Neill et al 2012).

Objectifs de la thèse :

Au début de ma thèse, j'ai étudié le rôle de l'héparanase sur la signalisation HGF/SF-MET dans un milieu hypoxique acidifiant. En effet, des études ont montré que l'expression du gène de l'héparanase ainsi que son activité étaient augmentées en hypoxie (Nasser et al 2005, Wu et al 2010). L'objectif était d'une part de déterminer si l'hypoxie menait à une acidification du milieu extracellulaire suffisante pour permettre l'activité de l'héparanase ; et d'autre part, si dans des cellules surexprimant l'héparanase en milieu hypoxique, la signalisation HGF/SF-MET était modifiée. Ces résultats seront abordés dans la première partie du chapitre « résultats ».

Malgré des résultats prometteurs, j'ai poursuivi ma thèse en me concentrant sur les conséquences de l'hypoxie sur la signalisation de MET. En effet, lors de mes premières expériences, un phénomène intéressant et original a été observé et nous avons décidé de réorienter mon travail dans l'exploration de ce résultat.

Donc, par la suite, mon travail s'est principalement axé sur le rôle de l'hypoxie dans la régulation de la signalisation HGF/SF-MET et fait l'objet d'un article original. D'autres expérimentations relatives à ce travail seront discutées dans la partie « expériences complémentaires ».

Résultats

Partie I :

Au cours de cette thèse, nous nous sommes initialement intéressés au rôle de l'héparanase, enzyme dégradant les héparanes sulfates (HS), composant majeur de la matrice extracellulaire et connu pour constituer un réservoir de facteurs de croissance comme l'HGF/SF. Par conséquent, le remaniement des héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) et HS, permettant le relargage de l'HGF/SF, pourrait mener à une plus forte activation du récepteur MET. L'héparanase étant la seule enzyme de dégradation des HS et n'étant active qu'en milieu acide, nous nous sommes penchés sur les conditions pouvant mener à une acidification du milieu extracellulaire et à l'hypoxie. En effet, l'hypoxie ayant été décrite comme induisant une acidification du microenvironnement, nous nous sommes interrogés sur les interactions éventuelles entre héparanase, hypoxie et signalisation HGF/SF-MET.

Ces travaux ont nécessité la mise en place de nombreuses techniques et de méthodologies nouvelles dans le laboratoire (culture en atmosphère contrôlée, mesure du pH extracellulaire en temps réel.).

I.1. Matériels et Méthodes

I.1.1. Culture cellulaire et transfection

Deux lignées cellulaires dérivées de fibrosarcome humain (HT1080) ont été générées. La première a été stablement transfectée par le plasmide d'expression eucaryote pcDNA 3.1 V5-His (Invitrogen®) vide. La seconde par le pcDNA 3.1 V5-His (Invitrogen®) codant le cDNA de l'héparanase humaine (HPSE) en phase avec le tag V5-His.

Les cultures cellulaires sont réalisées dans du DMEM Gibco® (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté avec 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal) et 1% de ZS (Zell Shield™). Afin de maintenir l'expression du transgène dépendant du gène Néo apportant une résistance à la généticine (G418), cet antibiotique est ajouté au milieu de culture.

I.1.2. Mesure du pH extracellulaire et de l'oxygène dissous

Les mesures sont effectuées en temps réel grâce au système de mesure SDR SensorDish® (PreSens®) qui exploite une technique non invasive et non destructive de monitoring basée sur des capteurs fluorescents présents au fond des puits des boîtes de culture cellulaire à 6 ou 24 puits. Ces capteurs sont capables de mesurer le pH (HydroDish®) et le taux d'oxygène dissous (OxoDish®) ou les deux simultanément (OxoHydroDish®) directement dans le milieu de culture.

I.1.3. Adaptation du milieu de culture cellulaire

Etant donné le caractère tamponnant inhérent aux milieux de culture standards et notre volonté d'étudier le caractère acidifiant des cellules en conditions de normoxie ou d'hypoxie contrôlées, les milieux usuels ont été modifiés en ajustant leur pH et leur pouvoir tampon. Une concentration de 0.37mg/mL de bicarbonate de sodium (NaHCO_3^-) est utilisée pour la reconstitution d'un milieu DMEM 'standard' (pH entre 7.6-7.8). Un milieu sans bicarbonate est également préparé. Ces milieux sont additionnés de 1% ou de 0.1% de SVF et de 1% de ZS, filtrés, puis mélangés pour la préparation de deux autres milieux à pH différents : un milieu à un pH 'physiologique' (entre 7.1 et 7.2) et un milieu à un pH 'acide' (entre 6.5 et 6.7).

I.1.4. Lyse cellulaire, extraction protéique, dosage et Western Blotting

Voir matériel et méthodes de l'article. Un anticorps primaire spécifique en plus a été utilisé : Anticorps anti-HPSE dilué au 1/1000^{ème} (HP130 - InSight®). La révélation des blots a également été faite à l'aide d'un analyseur d'images : LAS-3000, Fujifilm®.

I.1.5. Extraction et analyse d'ARN

Les ARN totaux sont obtenus en utilisant la technique d'extraction au TRIzol® suivie d'un traitement DNase (TURBO DNA-free™ Kit – ambion® by life technologies™). L'intégrité des ARN est vérifiée sur un gel d'agarose à 1% en TBE. L'ADNc est généré par transcription inverse (AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit) et la Réaction en Chaîne par Polymérase quantitative (qPCR) est effectuée à l'aide d'un Stratagene Mx3005P en utilisant le Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent® Technologies) et des primers spécifiques.

Deux gènes ont été étudiés : l'Anhydrase Carbonique de type 9 (CAIX) et l'héparanase (HPSE) dont les séquences sont :

- CAIX :	TTCCCTGCTGGAGTGGACAG TGTGCTGCCTTCTCATCTGC	Sens Anti-sens
- HPSE :	TTGAATGGACGGACTGCTACC CGCCTCCATATGCAGAGCTT	Sens Anti-sens

L'analyse des résultats est calculée selon la méthode du $2\Delta\Delta C_t$ en comparant les conditions normoxiques et hypoxiques : $2^{(C_t \text{ gène cible } x - C_t \text{ RPLP0}) - (C_t \text{ gène cible } x - C_t \text{ RPLP0 de la valeur de référence})}$ en normoxie ou en hypoxie par rapport au niveau d'expression à 0h en normoxie (condition contrôle).

I.1.6. Culture sur matrice de Matrigel™.

Les cellules sontensemencées sur un lit de Matrigel™ coulé dans des microslides (Ibidi® - Biovalley®). Les cellules (traitées ou non par de l'HGF/SF, en conditions normoxiques

ou hypoxiques) sont ensuite observées sous microscope à contraste de phase (x40) (Nikon® Eclipse TS100).

I.2. Résultats

L'ensemble des travaux de cette première partie a été réalisé sur la lignée cellulaire HT1080 issue d'un fibrosarcome humain. Dans le cadre de cette étude, nous avons généré deux lignées stables : une lignée HT1080 transfectée par le plasmide d'expression eucaryote codant l'ADNc de l'héparanase humaine (appelée HT1080 HPSE+) et une lignée transfectée par le plasmide d'expression eucaryote vide (appelée HT1080).

I.2.1. Analyse des expressions de l'héparanase (HSPE) et de l'Anhydrase Carbonique de type 9 (CAIX) en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées :

Dans un premier temps, nous avons voulu nous assurer de la surexpression de l'héparanase par les cellules HT1080 HPSE+ par rapport aux HT1080. Nous avons donc analysé l'expression du gène de l'héparanase en normoxie et en hypoxie à différents temps d'incubation (4h, 8h et 24h). Les résultats sont illustrés au niveau de la figure 24 A.

Le gène de référence (*house keeping gene*) utilisé lors de ces expériences de qPCR est le RPLP0 (60S acidic ribosomal protein P0). Les analyses et traitement des données ont été effectués selon la méthode du $2\Delta\Delta C_t$ définie précédemment.

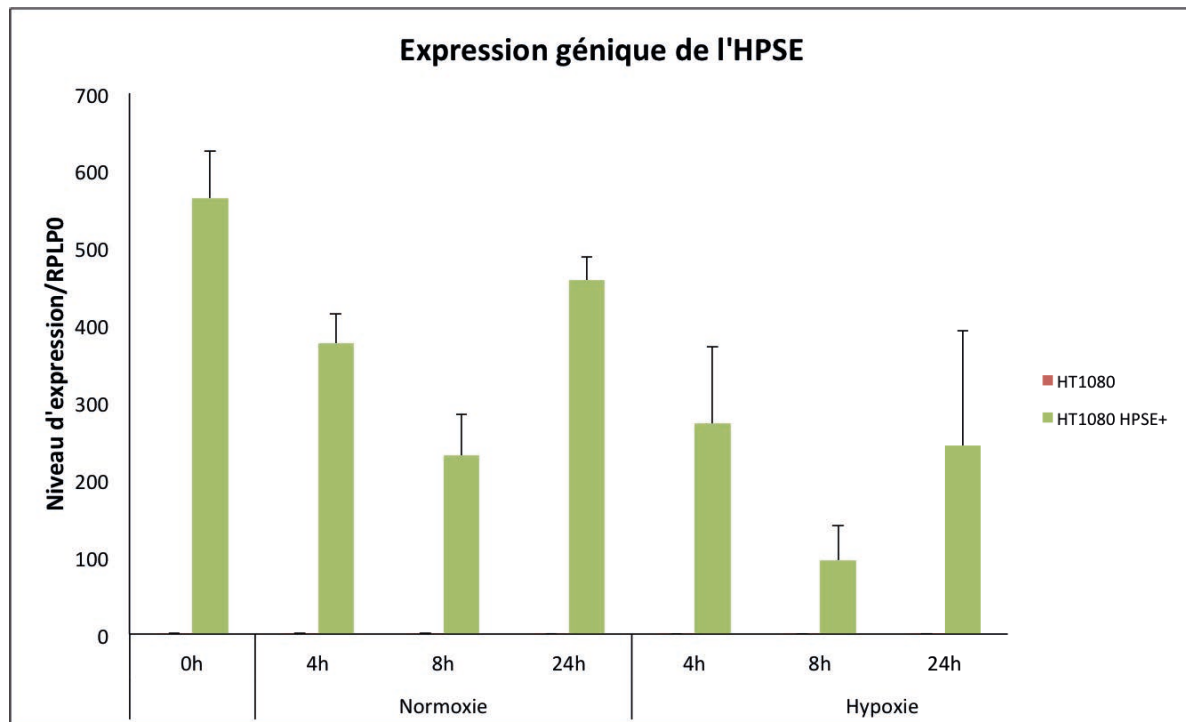


Figure 24 A – Expressions géniques de l'HPSE dans les HT1080 après 4, 8 et 24 heures d'hypoxie.

Les cellules HT1080 et HT1080 HPSE+ ont été cultivées en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées pendant 4, 8 et 24 heures. Les niveaux d'expression relative de l'héparanase (HPSE) ont été mesurés par RTqPCR par rapport au temps 0 des HT1080. Les résultats sont montrés sous forme d'induction/répression pour chaque gène en conditions hypoxiques et normoxiques (n=3, \pm SD).

Comme nous pouvions nous y attendre, l'expression de l'héparanase est très fortement surexprimée dans les HT1080 HPSE+ alors qu'elle est très faible (quasiment non détectable) dans les HT1080.

Par la suite, nous avons voulu confirmer l'état hypoxique des cellules en mesurant l'expression du gène d'un marqueur d'hypoxie, l'Anhydrase Carbonique de type 9 (CAIX). Les résultats sont illustrés au niveau de la figure 24 B.

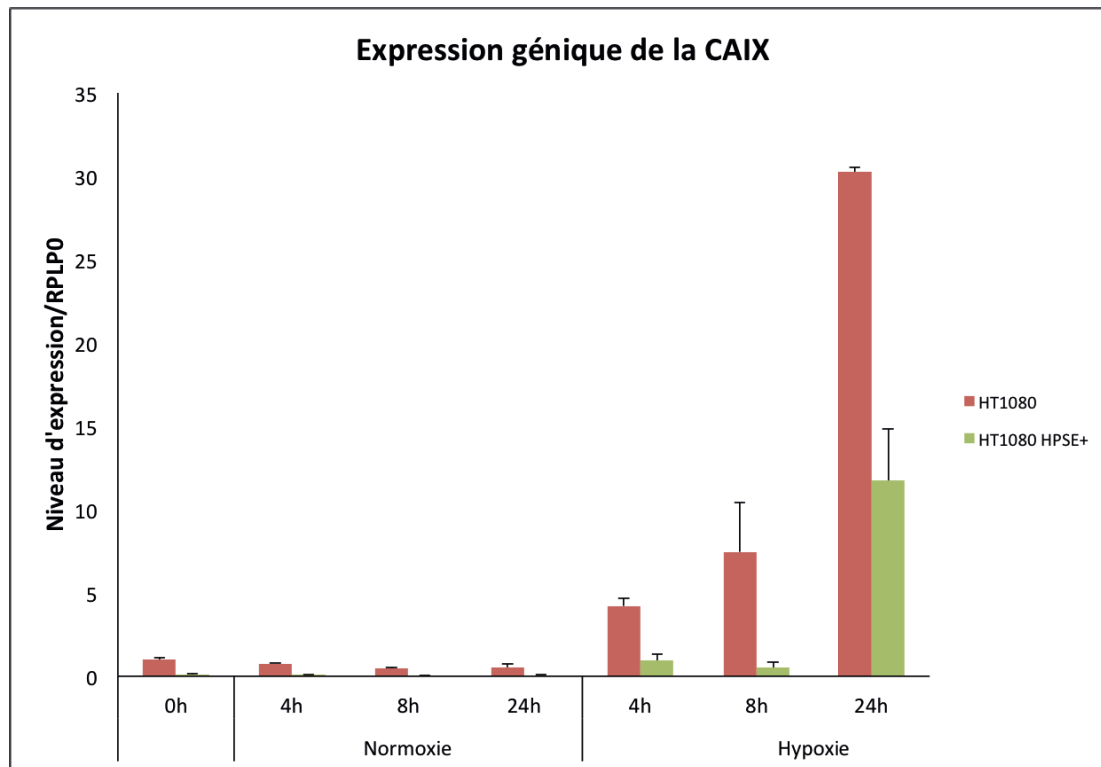


Figure 24 B – Expressions géniques de la CAIX dans les HT1080 après 4, 8 et 24 heures d'hypoxie.

Les cellules HT1080 et HT1080 HPSE+ ont été cultivées en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées pendant 4, 8 et 24 heures. Les niveaux d'expression relative de l'anhydrase carbonique IX (CAIX) ont été mesurés par RTqPCR par rapport au temps 0 des HT1080. Les résultats sont montrés sous forme d'induction/répression pour chaque gène en conditions hypoxiques et normoxiques (n=3, \pm SD).

Comme attendu, nous remarquons que l'expression génique de la CAIX augmente de manière croissante au fur et à mesure de l'exposition à l'hypoxie et ce dès 4 heures. De façon surprenante, cette induction est fortement réprimée chez les HT1080 surexprimant l'héparanase.

I.2.2. Analyse de l'expression protéique de la HPSE et de la CAIX en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées :

De manière complémentaire, nous avons analysé l'expression protéique de la CAIX et de la HPSE. Les résultats sont illustrés dans la figure 25. Cette expérimentation a été effectuée en duplicat pour chaque condition.

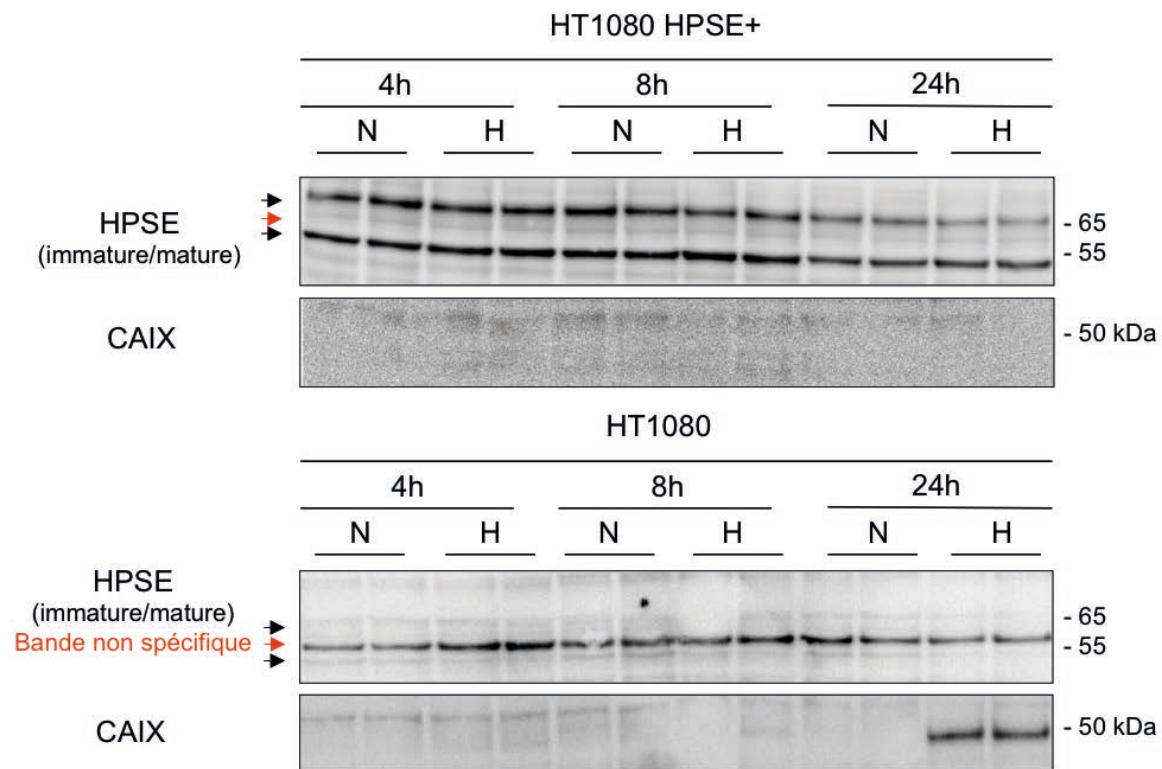


Figure 25 – Expression de la HPSE et de la CAIX dans les HT1080 et HT1080 HPSE+ en conditions de normoxie et d’hypoxie contrôlées (4h, 8h et 24h).

Les cellules HT1080 et HT1080 HPSE+ ont été cultivées en conditions de normoxie (N) et d’hypoxie (H) contrôlées pendant 24 heures. Les expressions de HPSE et CAIX ont été analysées par Western Blot.

De façon cohérente, nous détectons la présence de l’héparanase (HPSE) dans les HT1080 HPSE+ alors que son expression est indétectable dans les HT1080. En revanche, la CAIX est bien induite chez les HT1080 à 24 heures mais est absente chez les HT1080 HPSE+. Cette observation confirme la répression génique mesurée en qPCR et suggère l’existence d’un lien entre l’expression de ces deux enzymes.

I.2.3. Etude de la morphogénèse de branchement en Matrigel™ :

Sans traitement, les HT1080 sont capables de former spontanément par morphogénèse un réseau branché sur Matrigel™. Nous avons donc voulu étudier leurs comportements en conditions de normoxie et d’hypoxie contrôlées. Pour ce faire, les cellules ont étéensemencées sur Matrigel™ et ensuite traitées ou non avec de l’HGF/SF à 10 ng/mL et mises en normoxie ou en hypoxie pendant une nuit (figure 26).

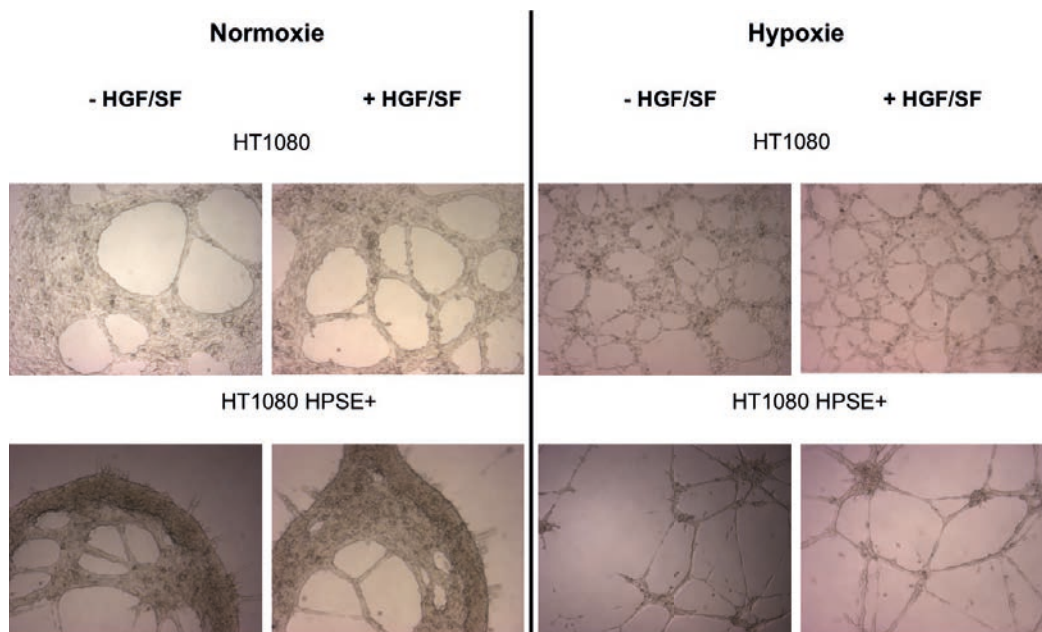


Figure 26 - Morphologie des cellules en culture sur du Matrigel™ (18h).

Les cellules HT1080 et HT1080 HPSE+ ont été cultivées sur du Matrigel™ pendant 18 heures en présence ou en absence de stimulation à l'HGF/SF (10 ng/mL) en conditions de normoxie ou d'hypoxie contrôlées (x40)

Nous remarquons que les cellules ne s'organisent pas de la même manière à l'état basal selon qu'elles surexpriment ou non l'héparanase. En effet, nous remarquons que les HT1080 forment des réseaux alors que les HT1080 HPSE+ forment des amas compacts et rigides avec des branchements à l'intérieur de ces agrégats. L'ajout du HGF/SF semble avoir peu ou pas d'effet sur l'organisation des cellules. En revanche, placées en hypoxie, les HT1080 tendent à former des réseaux plus ramifiés et avec des parois et des axes plus fins. Quant aux HT1080 HPSE+ elles semblent changer d'organisation et tendent à former également des réseaux plus fins. Encore une fois, l'ajout du HGF/SF semble avoir peu ou pas d'effet sur la formation des réseaux. Il semblerait donc qu'en conditions hypoxiques le réseau formé par les HT1080 est plus fin et branché et les différences de phénotypes s'estompent entre les HT1080 et les HT1080 HPSE+.

I.2.4. Mesure de l'acidification du milieu de culture :

Puisque l'héparanase n'est active qu'en milieu acide (pH<6.8) nous avons voulu déterminer la capacité d'acidification des milieux de culture par nos lignées cellulaires

en conditions hypoxiques. Pour cela, nous avons utilisé un milieu 'standard' (DMEM) dans lequel nous avons ajusté le pH afin d'obtenir des milieux de pH 'basique' (7.6-7.8), de pH 'physiologique' (7.1-7.2) et de pH 'acide' (6.5-6.7), tous contenant 0,1% de sérum. Nous avons par la suiteensemencé nos cellules dans des boîtes de cultures spécifiques dotées de capteurs fluorescents capables de mesurer le pH et l'oxygène dissous. Les cellules ont été cultivées pendant 5 jours en hypoxie et les résultats sont illustrés dans la figure 27.

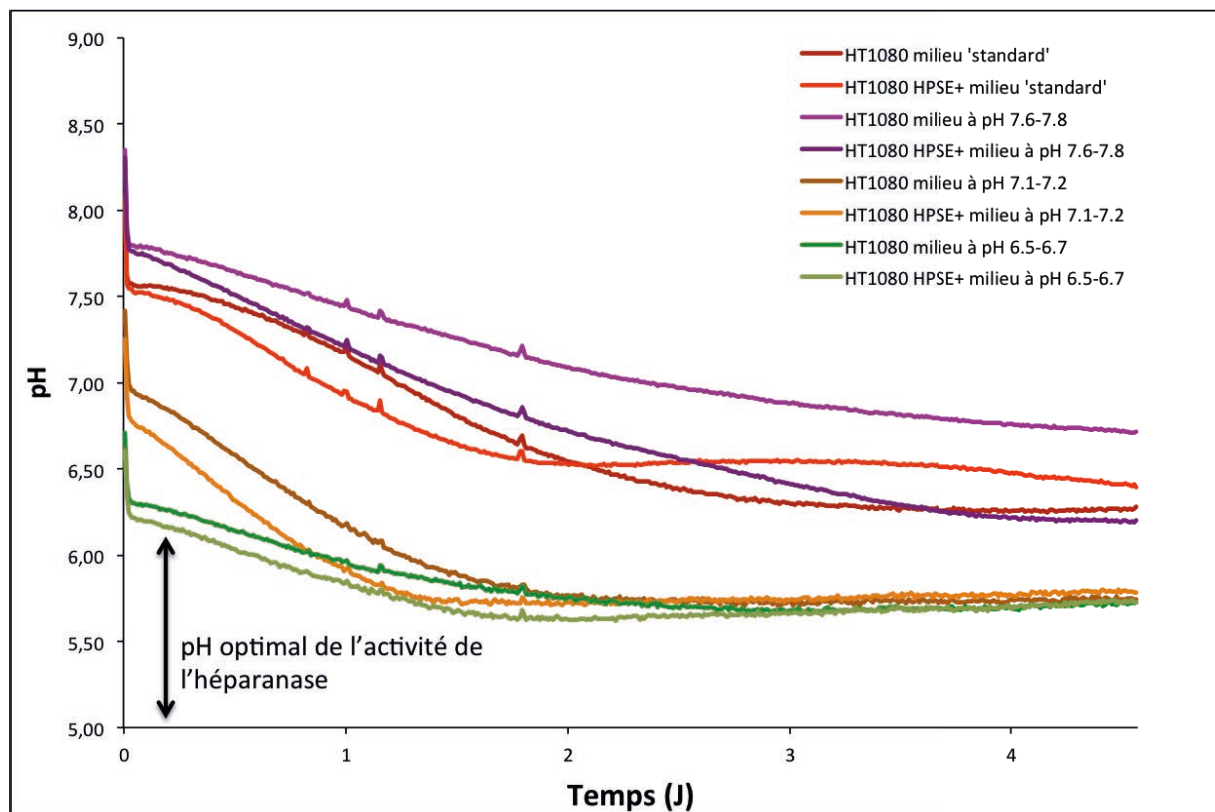


Figure 27 – Mesure de l'acidification du milieu extracellulaire par les HT1080 et les HT1080 HPSE+ au cours du temps

Les cellules HT1080 et HT1080 HPSE+ ont été cultivées pendant 5 jours en conditions d'hypoxie contrôlée dans des milieux à pH différents : milieu 'standard' (DMEM), milieu à pH 'basique' (7.6-7.8), milieu à pH 'physiologique' (7.1-7.2) et milieu à pH 'acide' (6.5-6.7).

Nous remarquons que les HT1080 HPSE+ acidifient plus rapidement le milieu de culture que les HT1080 et ce, malgré l'absence d'expression de la CAIX. Par ailleurs, nous remarquons que toutes nos cellules sont capables d'acidifier le milieu extracellulaire jusqu'à un pH permettant une activité de l'héparanase (<6.8). Néanmoins, les milieux que nous avons préparé à pH 'physiologique' et 'acide' permettent une acidification qui

peut atteindre un pH optimal pour l'activité de l'héparanase (entre 5 et 6). Cependant, le maintien des cellules à un tel pH (< 6) engendre leur mort rapide.

Par la suite, nous avons utilisé ces milieux à différents pH dans nos expériences d'analyse par *western blot* de l'expression des différentes protéines impliquées dans la signalisation HGF/SF-MET. Nous n'avons pas remarqué de différences notables de l'influence pH sur cette signalisation.

En conclusion, nous observons en hypoxie une baisse du pH qu'on a pu quantifier et qui est compatible avec une activité optimale de l'héparanase. En revanche, nous n'observons pas de modification de la signalisation HGF/SF-MET en présence de surexpression de l'héparanase, ni en présence de milieux à différents pH.

Néanmoins, au cours de ces travaux, nous avons observé une forte baisse de la phosphorylation du récepteur MET en hypoxie, et ce indépendamment de la présence ou non d'une surexpression de l'héparanase ou de la modification du pH. En effet, en conditions normoxiques, MET est phosphorylé suite à une activation par de l'HGF/SF. Ceci mène à l'activation de la voie de signalisation en aval AKT évaluée par la détection de sa forme phosphorylée. En revanche, en conditions hypoxiques, on remarque une forte baisse de la phosphorylation de MET suite à une activation par de l'HGF/SF. Cette baisse de phosphorylation n'a cependant pas de conséquences sur les voies de signalisation en aval. En effet, AKT est phosphorylé de façon soit équivalente soit plus intense. Ces résultats ont été obtenus dans les lignées HT1080 et HT1080 HPSE+ suggérant que l'héparanase ne modifie pas la signalisation HGF/SF-MET. Ces résultats sont illustrés dans la figure 28 (étant donné la similarité des résultats obtenus dans les deux types cellulaires, seules les HT1080 HPSE+ sont illustrées).

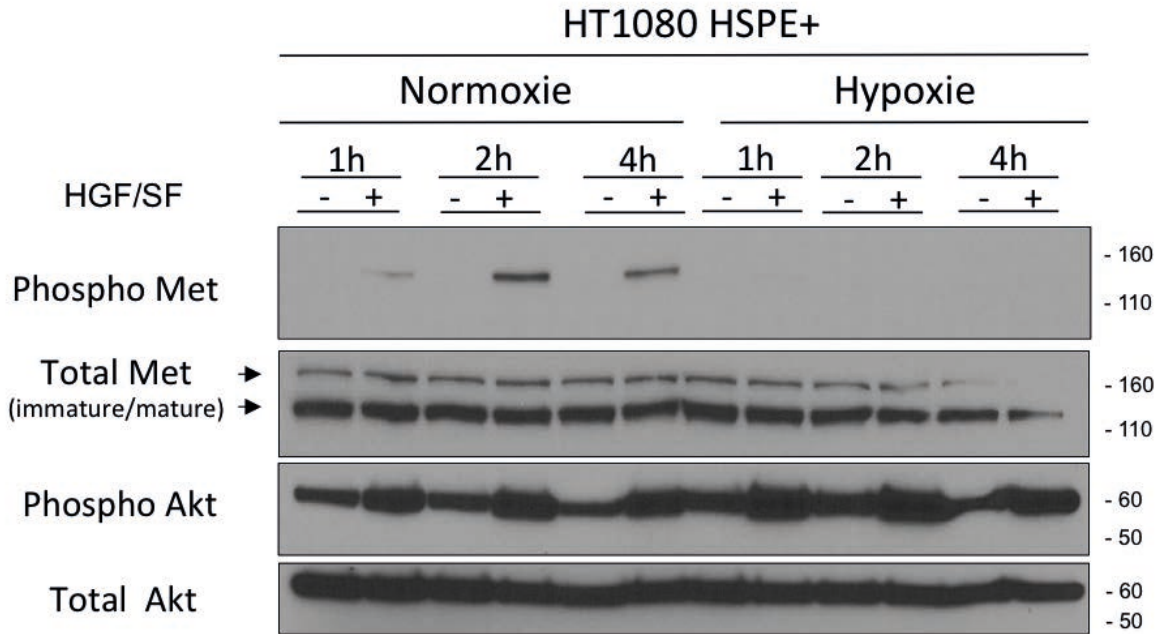


Figure 28 – Signalisation HGF/SF-MET en présence ou pas d'HGF/SF dans les HT1080 HPSE+ en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées.

Les HT1080 HPSE+ ont été incubées en normoxie et en hypoxie pendant 1h, 2h et 4h puis stimulées ou pas avec de l'HGF/SF à 10ng/mL pendant 10min. Les expressions de MET, Phospho-MET, Akt, Phospho-Akt, Erk et Phospho-Erk ont été analysées par Western Blot.

Au vu de ces résultats et étant donné que ni l'héparanase ni les modification du pH ne semblent modifier la signalisation HGF/SF-MET en hypoxie, nous avons orienté notre travail sur l'étude de la baisse de phosphorylation de MET dans ces conditions hypoxiques. Cette étude est détaillée dans la partie II de ce chapitre.

Partie II : Influence de l'hypoxie sur la signalisation HGF/SF-MET.

II.1. Résumé et contexte de la publication :

Peu de travaux se sont consacrés à l'effet de l'hypoxie sur la signalisation HGF/SF-MET. La plupart de ceux ayant étudié cet effet ont relevé une augmentation de l'expression du récepteur de manière HIF1a dépendante et un accroissement de l'invasion liée à la signalisation HGF/SF-MET. D'autres études ont analysé les voies de signalisation en aval de l'activation de MET et ont remarqué une augmentation de l'activation de la voie ERK (liée à une diminution de l'activité des phosphatases DUSP2) et une baisse de l'activation de la voie AKT (liée à une augmentation de l'activité de la phosphatase PP2A et de la kinase PKC) (Lee et al 2014). Dans toutes ces études, la phosphorylation de MET n'a été que peu évaluée. De plus, celles-ci a été effectuée en utilisant des composés chimiques qui miment les réponses d'adaptations cellulaires à l'hypoxie (CoCl₂ notamment) et montrent que la phosphorylation de MET n'est pas affectée en hypoxie.

Ainsi, au cours de ma thèse, j'ai démontré que dans des conditions hypoxiques, la phosphorylation de MET sur l'ensemble des résidus tyrosine (Y1003, Y1234, Y1235 et Y1349) induite soit par son ligand, par des mutations activatrices ou par sa surexpression, est diminuée de manière drastique *in vitro* et *in vivo*. Cette baisse apparaît très rapidement et est réversible quand les cellules sont replacées en normoxie. Alors que la phosphorylation de GAB1, principal partenaire de MET, est également diminuée en hypoxie, l'activation des voies de signalisation en aval AKT et ERK n'est pas affectée. Cependant cette activation est bien dépendante de l'activité du récepteur et de GAB1. De façon cohérente, diverses réponses cellulaires induites par l'HGF/SF, incluant la motilité, la dispersion, la morphogénèse et la survie sont induites de manière efficaces autant en normoxie qu'en hypoxie. De manière intéressante, le traitement par deux inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) ciblant MET (PHA-665752 et SU11274) est moins efficace en hypoxie. En effet, l'inhibition des voies de signalisation AKT et ERK ainsi que les réponses cellulaires induites par MET est moins efficace en conditions hypoxiques que normoxiques. De la même manière que pour la phosphorylation de MET, la résistance à ces TKI est un phénomène réversible. Ainsi, alors que l'hypoxie n'affecte pas

les voies de signalisation en aval ni les effets biologiques, elle diminue la sensibilité de MET aux TKI le ciblant et donc induit une résistance immédiate.

Ces travaux sont repris en détail dans le manuscrit qui suit et qui a fait l'objet d'une soumission d'article original.

II.2. Article :

Hypoxia leads to decreased autophosphorylation of the MET receptor and promotes its resistance to tyrosine kinase inhibitors

Meriem Sarah Mekki¹, Charlotte Paquet¹, Marie-Christine Copin^{1,2}, Catherine Leroy¹, Zoulika Kherrouche¹, Jean-Paul Bonte³, Oleg Melnyk¹, Jérôme Vicogne^{1*} and David Tulasne^{1*}

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

²Centre de Biologie Pathologie, CHRU de Lille, France

³EA 4481 Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Université de Lille, 3 rue du Professeur Laguesse, 59006 Lille, France

*** Co-corresponding authors :**

Jérôme Vicogne and David Tulasne, CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, Université de Lille, 1 Rue Pr Calmette, CS50447, 59021 Lille, France

Phone : 0033 3 20 87 12 49/ 12 57 ; Fax : 0033 3 20 87 11 11

e-mail : jerome.vicogne@ibl.cnrs.fr / david.tulasne@ibl.cnrs.fr

Keywords: MET, Receptor tyrosine kinase, Hepatocyte growth factor/scatter factor, Hypoxia, Tyrosine kinase inhibitor, Resistance, Phosphorylation

Running title: MET phosphorylation under hypoxia

Abstract

The receptor tyrosine kinase MET and its ligand, the Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF), are essential to the migration, morphogenesis, and survival of epithelial cells. In addition, dysregulation of MET signaling has been shown to promote tumor progression and invasion in many cancers. Inside tumors, hypoxia is also a crucial phenomenon promoting invasion, metastasis, and resistance to treatment.

We show that under hypoxia, MET phosphorylation resulting from ligand stimulation, an activating mutation, or overexpression is drastically decreased in both cell culture and experimental tumors. This decrease occurs within minutes and is reversible upon return to normoxia. While phosphorylation of the proximal signaling adaptor GAB1 is also decreased under hypoxia, activation of the downstream kinases ERK and AKT is not affected, but remains dependent on MET receptor activity. Consistently, several cellular responses induced by HGF/SF, including motility, morphogenesis, and survival, are still effectively induced. Interestingly, two MET-targeting tyrosine kinase inhibitors (TKIs) affect the downstream kinases ERK and AKT and MET-induced cellular responses less efficiently under hypoxia than under normoxia. Like MET phosphorylation, this resistance to TKIs is reversible. Thus, although hypoxia does not affect downstream signaling or cellular responses, it causes immediate resistance by decreasing MET sensitivity to TKIs. These results may prove useful in designing MET-targeted therapies for solid tumors.

Introduction

MET is the high-affinity receptor tyrosine kinase (RTK) for the Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF). The *MET* gene was identified as an oncogene in tumorigenicity assays (Park et al., 1986), while HGF/SF was discovered independently as a growth factor for hepatocytes (Nakamura et al., 1989) and as a scatter factor for epithelial cells (Gherardi et al., 1989; Stoker et al., 1987). The MET receptor is expressed mainly at the surface of cells of epithelial origin, whereas HGF/SF is secreted by fibroblasts. This ligand-receptor pair plays a crucial role in the epithelial-mesenchymal dialogue during embryonic development and later during tissue regeneration in adults (Trusolino et al., 2010).

The MET receptor is a 190-kDa glycoprotein comprising an N-terminal HGF/SF-binding extracellular domain, a single transmembrane domain, and an intracellular domain containing the kinase and C-terminal domains (Birchmeier and Gherardi, 1998). HGF/SF binding to MET triggers its dimerization and its activation by *trans*-autophosphorylation of two tyrosine residues (Y1234 and Y1235) located in the kinase domain. Thereafter, phosphorylation of tyrosines Y1349 and Y1356, located in the MET C-terminal domain and constituting a multisubstrate docking site, is sufficient to promote signal transduction and the biological functions of MET. Signaling proceeds through recruitment of an array of signaling mediators such as Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) and the c-Casitas B-lineage Lymphoma (c-CBL) protein and adaptors such as Growth Factor Receptor-Bound protein 2 (GRB2) and GRB2-Associated-Binding protein 1 (GAB1) (Blumenschein et al., 2012; Ponzetto et al., 1994; Rosario and Birchmeier, 2003; Sachs et al., 1996). GAB1 is a crucial effector recruited by MET. Its phosphorylation creates multiple binding sites for signaling proteins such as the Shp-2 tyrosine phosphatase and the p85 subunit of PI3K (Blumenschein et al., 2012; Gherardi et al., 2012; Rosario and Birchmeier, 2003). Hence, ligand-dependent activation of MET leads to activation of multiple downstream signaling pathways such as the PI3K/AKT and RAS/MAPK pathways.

Many mechanisms leading to MET inactivation have been brought to light. First, ligand-dependent phosphorylation of the juxtamembrane tyrosine 1003 of MET triggers recruitment of the E3 ubiquitin ligase c-CBL and receptor internalization and degradation (Peschard et al., 2001). MET also undergoes proteolytic cleavages by endopeptidases which regulate its half-life under steady-state conditions (Ancot et al., 2012). In response to HGF/SF stimulation, furthermore, many phosphatases such as PTP1B, T-cell PTP (Sangwan et al., 2008), DEP-1 (Palka et al., 2003), and Shp-2 (Maroun et al., 2000) are involved on either the decrease of MET tyrosine phosphorylation or the regulation of its signaling.

HGF/SF-MET signaling is involved in a wide diversity of cellular responses, such as colony dispersal (scattering), proliferation, epithelial cell motility, branched tubule formation upon culture on matrix substitutes, and cell survival upon induction of apoptosis (Birchmeier et al., 2003; Blume-Jensen and Hunter, 2001; Gherardi et al., 2012; Lemmon and Schlessinger, 2010; Rosario and Birchmeier, 2003; Ullrich and Schlessinger, 1990). In agreement with the biological roles of HGF/SF-MET signaling, its dysregulation is directly linked to tumorigenesis. In many tumors MET, HGF/SF, or both are overexpressed and associated with poor prognosis (Birchmeier et al., 2003; Boccaccio and Comoglio, 2006; Go et al., 2010; Humphrey et al., 2006; Lee et al., 2011; Nakajima et al., 1999). MET mutations have also been linked to cancer in patients suffering from hereditary papillary renal carcinoma (RCC) (Schmidt et al., 1997; Schmidt et al., 1999). Sporadic mutations have been detected in many cancer types, including

RCC and non-small-cell lung cancers (NSCLC)(Blumenschein et al., 2012). In cells displaying *met* gene amplification, ligand-independent activation of the receptor can also occur. This is the case, for example, in about 5% of gastric cancers(Kawakami et al., 2014). It is due to the fact that massive *met* gene overexpression leads to spontaneous dimerization and constitutive kinase activation of the receptor(Ponzetto et al., 1991).

Many MET-targeting therapies are under growing development, as attested by about 240 clinical trials(Furlan et al., 2014). The investigated molecules include tyrosine kinase inhibitors (TKIs) and antibodies interfering with the ligand/receptor interaction. Most TKIs are small molecules specifically targeting the MET kinase domain, such as ATP-competitive inhibitors(Krause and Van Etten, 2005). Recently, potential mechanisms of acquired resistance to MET-targeting therapies have been described. In gastric carcinoma cell lines, resistance to MET-targeting TKIs can result either from a point mutation in the MET activation loop or from EGFR activation bypassing inhibition of MET downstream signaling(Qi et al., 2011). Another study focusing on gastric cancer and NSCLC models has established *met* amplification followed by *KRAS* amplification(Cepero et al., 2010).

Besides genetic changes leading to alterations and dysregulations of signal transduction pathways, the microenvironment plays an important role in tumor establishment, progression, spread, and metastasis(Sullivan and Graham, 2007; Taddei et al., 2013). In particular, when high cell metabolism and rapid proliferation cause a solid tumor to outgrow its blood supply, tumor cells are exposed to conditions (hypoxia and nutrient deficiency) that trigger major changes in their physiology(Brahimi-Horn et al., 2007a; Brahimi-Horn et al., 2007b; Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2007). During hypoxia, the oxygen pressure to which tumor cells are exposed can fall below 1%(Taddei et al., 2013). Cell detection of and adaptation to hypoxia is mediated mainly by activation of transcription factors of the hypoxia-inducible factor (HIF) family. This response is regulated post-transcriptionally through stabilization of the oxygen-labile alpha subunit of HIF(Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Under normoxia, HIF1a is hydroxylated on several proline residues, in an oxygen-dependent reaction(Chan et al., 2002), by a family of prolyl hydroxylases (PHDs). Hydroxylated HIF1a is recognized by the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor ubiquitin ligase and hence ubiquitinated and degraded. Under hypoxic conditions, HIF1a is stabilized and dimerizes with nuclear HIF1b. This complex binds to hypoxia-responsive elements in DNA and enhances transcription of target genes involved in promoting adaptations to hypoxia.

In patients, hypoxia is viewed as a marker of poor prognosis, associated with uncontrolled tumor growth, angiogenesis, invasiveness, metastasis, and resistance to radio- and chemotherapy(Sullivan and Graham, 2007; Wilson and Hay, 2011). For instance, it promotes angiogenesis through upregulation of VEGF and VEGFR2 synthesis, which may further enhance metastatic spread and promote intravasation(Dvorak et al., 1999; Shweiki et al., 1992; Srinivasan et al., 2015). Hypoxia additionally enhances receptor-tyrosine-kinase-mediated signaling(Wang and Ohh, 2010), increasing *hgf/sf* and *met* expression(Ide et al., 2006; Pennacchietti et al., 2003). In response to HGF, the downstream RAS-ERK pathway is activated and invasion increases(Bottaro and Liotta, 2003; Lee et al., 2014; Pennacchietti et al., 2003).

Here we have examined how hypoxia affects MET receptor activation. We show that it strongly and dynamically decreases the level of MET tyrosine phosphorylation, surprisingly without affecting

downstream signaling pathways and biological responses. Importantly, we show that hypoxia reduces MET sensitivity to TKIs. This work highlights a novel mechanism of immediate cell resistance to TKIs under hypoxic conditions.

Results

Hypoxia causes a drastic, dynamic, reversible decrease in MET phosphorylation

To investigate possible modulatory effects of hypoxia on MET signaling, we incubated various cell lines for 1 h or 24 h under normoxia (21% O₂) and hypoxia (1% O₂). Hypoxia was assessed on the basis of HIF1a stabilization or synthesis of carbonic anhydrase IX (CAIX). Under normoxia, as expected, 10 minutes of HGF/SF treatment of HeLa human cervix adenocarcinoma cells induced substantial phosphorylation of MET tyrosine residues 1234/1235 and led to activation of the AKT and ERK kinases, as revealed by detection of their phosphorylated forms. In contrast, hypoxia caused a strong reduction in MET phosphorylation in basal and after an HGF/SF stimulation (Fig. 1A), not only at residues 1234/1235, located in the kinase domain, but also at tyrosines 1003, in the juxtamembrane domain, and 1349, in the C-terminal domain. Similar results were obtained with various normal epithelial cell lines, including the canine kidney cell line MDCK (Fig. 1B) and the human mammary fibrocystic disease cell line MCF10A (Fig. 1C). Quantification of phosphorylated tyrosines 1234/1235 in MCF10A cells revealed a 90% decrease under hypoxia, as shown in Fig. 1D. Despite this decrease, activation of the downstream signaling kinases ERK and AKT was unaffected (Fig. 1A, B and C). When AlphaScreen® SureFire technology was used to obtain dose-response curves for AKT and ERK activation, no significant difference was observed between normoxic and hypoxic conditions (Fig. 1E). Similar results were obtained with cell lines established from human tumors, including the human fibrosarcoma cell line HT1080 (Supplementary Fig. S1A) and the human hepatocarcinoma cell line HepG2 (Supplementary Fig. S1B) and with primary adult epidermal keratinocytes (Supplementary Fig. S1C). In all these cells, MET phosphorylation was low or below the detection level under hypoxia, while downstream activation of AKT and ERK was unchanged or even stronger. This suggests that the observed effect of hypoxia is widespread. While hypoxia led to reduced MET phosphorylation, EGF-induced EGFR phosphorylation was only slightly affected in MCF10A (Supplementary Fig. S1D) and HT1080 Cells (Supplementary Fig. S1E). Moreover, phosphorylation of GAB1, an adaptor recruited by MET, was also decreased in HT1080 cells under hypoxia (Supplementary Fig. S1A). It is worth stressing that we observed no major difference between hypoxia and normoxia in the global tyrosine phosphorylation pattern (as detected with anti-phosphotyrosine antibody), apart from a band of about 150 kDa that likely corresponded to activated MET (Supplementary Fig. S1F).

To evaluate whether the reduced MET phosphorylation observed after 10 minutes of HGF/SF treatment might merely reflect delayed MET stimulation under hypoxia, time courses of HGF/SF signaling were established for MCF10A cells. Under normoxia, the level of phosphorylated MET displayed a bell-shaped curve, with a maximum at 10 min. Under hypoxia, the signal for phosphorylated MET was much lower at every time point, while AKT and ERK phosphorylation still occurred and were not delayed (Fig. 2A). Clearly, the reduced MET phosphorylation observed at 10 min under hypoxia did not reflect a delayed response.

Next, HT1080 cells were placed under hypoxic conditions for 15 to 60 minutes in order to see how the MET phosphorylation level varies over time under hypoxia. This experiment confirmed the strong decrease in MET phosphorylation under hypoxia, whatever its duration. Importantly, MET

phosphorylation was restored within 15 minutes when the cells were reoxygenated (Fig. 2B). These results show that reduction of MET phosphorylation during hypoxia is a fast, dynamic and reversible phenomenon.

Under hypoxia, activation of the AKT and ERK pathways in response to HGF/SF depends on MET and GAB1

In order to assess whether AKT and ERK phosphorylation still depend on MET and GAB1 activation in cells cultured under hypoxia, synthesis of the MET and GAB1 proteins was inhibited with specific siRNAs. MCF10A cells were transfected with a pool of siRNAs targeting MET or GAB1 and analyzed as shown in Figures 3A and 3B, respectively. MET or GAB1 knockdown was found to inhibit AKT phosphorylation under both normoxia and hypoxia. It also inhibited ERK phosphorylation, albeit to a lesser extent. Similar results were obtained with individual siRNAs (Supplementary Fig. S2 A and B). Thus, although MET phosphorylation is strongly reduced under hypoxia, the HGF/SF-induced downstream AKT and ERK signaling pathways remain directly dependent on the MET receptor and the GAB1 adaptor.

Hypoxia-inducible factor stabilization does not decrease MET phosphorylation

Previous studies have shown MET phosphorylation to be mostly unaffected by the presence of cobalt chloride (CoCl₂), which is often used to mimic hypoxia because it stabilizes HIF1a (Lee et al., 2014). While both CoCl₂ and hydralazine were found to stabilize HIF1a as expected, they had no effect on the MET phosphorylation level observed upon HGF/SF stimulation. Thus, the effects of these chemical treatments are clearly different from those of low oxygen pressure (Fig. 4).

To investigate the mechanisms underlying the observed hypoxia-triggered reduction in MET phosphorylation, MCF10A cells were treated with the general tyrosine phosphatase inhibitor sodium orthovanadate. This treatment restored, under hypoxia, levels of MET phosphorylation similar to those observed under normoxia. This suggests that the lower level of MET phosphorylation observed under hypoxia could be due to phosphatase activation (Supplementary Fig. S3A). Although the Shp-2 phosphatase is known to regulate MET signaling, treatment with an Shp-2-specific inhibitor failed to restore MET phosphorylation under hypoxia, suggesting the involvement of another phosphatase (Supplementary Fig. S3B). Similar results were obtained with a PTP1B-specific inhibitor (data not shown).

In both cell culture and experimental tumors, hypoxia leads to reduced MET phosphorylation level even when MET phosphorylation is ligand independent

In gastric and pulmonary cancers, amplification of the *met* gene causes its overexpression, leading to ligand-independent activation of the receptor (Ponzetto et al., 1991). This phenomenon has been observed in both the gastric cancer cell line GTL16 and in the non-small-cell lung cancer cell line EBC-1. Constitutive activation of MET can also result from exon 14 deletion, which prevents MET degradation, as in the gastric cancer cell line HS746T. These different cell lines were used to measure the effect of hypoxia on ligand-independent MET phosphorylation. As observed in other cell lines, the MET phosphorylation level was strongly reduced in cells placed under hypoxia for 1 or 24 h (Supplementary Fig. S4). Treatment with HGF/SF did not modify MET phosphorylation, confirming ligand-independent activation of the

receptor in these cell lines. These results indicate that the reduction of MET phosphorylation observed under hypoxia does not involve HGF/SF binding or receptor accessibility.

In order to evaluate the MET phosphorylation status in animal models of hypoxia, GTL16 tumors were generated in immunodeficient mice. As expected, the tumors displayed intense staining for MET and its phosphorylated form by IHC. The centers of the tumors displayed large necrotic areas surrounded by ribbons of hypoxic cells stained with the hypoxia marker CAIX. Importantly, although most of the hypoxic areas still showed both MET and phospho-MET staining, some of them displayed intense MET staining but no phospho-MET staining, as shown in two representative examples (Fig. 5). Normoxic areas showed no such decoupling between MET and phospho-MET staining. These *in vivo* data demonstrate that hypoxia generated during tumor growth can lead to reduced MET phosphorylation.

Reduced MET phosphorylation under hypoxia does not alter HGF/SF-induced biological responses but decreases MET internalization

Because hypoxia causes a strong reduction in MET phosphorylation without affecting activation of the two main downstream pathways, we evaluated the impact of oxygen deprivation on various HGF/SF-induced biological responses. Under hypoxia and normoxia, HGF/SF-stimulated MDCK epithelial cells behaved similarly as regards morphogenesis (when cultured on an extracellular matrix substitute), scattering, migration (in gap-closure assays), and survival (when challenged with the apoptosis inducer anisomycin) (Fig. 6, A, B, C, and D, respectively). These results show that the drastic decrease in MET phosphorylation observed during hypoxia does not prevent the broad range of biological responses induced by MET in epithelial cells. On the other hand, when cells were treated with a MET agonist antibody and internalization of antibody-bound MET was monitored by immunofluorescence staining, reduced staining of intracellular vesicles was observed (Supplementary Fig. S5). This result indicates that hypoxia causes reduced MET internalization. It is consistent with the decrease in tyrosine 1003 phosphorylation observed under hypoxia, as this phosphorylation is involved in recruitment of the E3 ubiquitin ligase c-CBL.

Hypoxia induces resistance to MET-targeting tyrosine kinase inhibitors

Many RTK-targeting therapies rely on the design of ATP mimetics capable of binding to the ATP-binding pocket of the kinase domain. Interestingly, RTKs displaying constitutive kinase activation and thus an accessible ATP binding site are more sensitive to such inhibitors. In order to see how hypoxia might affect the sensitivity of the MET receptor to ATP mimetics, dose-response experiments were performed under hypoxia and normoxia with two MET-targeting TKIs, PHA-665752 and SU11274. Figure 7A shows that the concentration of PHA-665752 required to achieve substantial inhibition was higher under hypoxia than under normoxia (0.3 vs. 0.05 μ M). To achieve a similar level of inhibition with SU11274, it took about 3 times more inhibitor under hypoxia than under normoxia (Supplementary Fig. S6). Moreover, PHA-665752 efficiency on HGF/SF-induced AKT and ERK phosphorylations was quantified by AlphaScreen technology. Experiments showed an IC₅₀ 2.1 time higher under hypoxia than under normoxia for AKT inhibition and 2.4 higher for ERK inhibition (Fig. 7B). Furthermore, treatment with 0.1

μM PHA-665752 did not suppress HGF/SF-induced morphogenesis in MDCK cells cultured under hypoxia, in contrast to the same cells cultured under normoxia (Fig. 7C).

As the decrease in MET phosphorylation observed under hypoxia was reversible upon reoxygenation, we tested whether sensitivity to MET-targeting ATP mimetics might likewise be restored in cells subjected to the same hypoxia/normoxia sequence. While cells cultured under hypoxia became resistant to both PHA-665752 and SU11274, subsequent restoration of normoxia for 10 min was sufficient to restore sensitivity to both compounds (Fig. 7A and B). Thus, both the decrease in MET phosphorylation and resistance to MET-targeting TKIs involve dynamic and reversible mechanisms.

Discussion

The first step in MET activation is trans-autophosphorylation at several crucial tyrosine residues, notably tyrosines 1234 and 1235 within the kinase domain. After this initial step, MET further undergoes autophosphorylation of tyrosines 1349 and 1356 within the C-terminal domain, which constitutes a docking site for numerous substrates involved in downstream signaling. Phosphorylation of tyrosine 1003 is next required for efficient degradation of the ligand-activated receptor and termination of signaling. Here we show that phosphorylation of all these MET residues is drastically reduced under hypoxic conditions, while activation of the downstream signaling kinases AKT and ERK remains unaffected. Consequently, the biological responses under the control of MET are still present under hypoxia.

While the MET activation status has already been investigated under hypoxia (Lee et al., 2014), such a drastic reduction in MET phosphorylation has not been described before. Up to now, MET phosphorylation has usually been evaluated after treatment with CoCl₂, a chemical often used to mimic the response of cells to hypoxia. Our work indicates that oxygen deprivation strongly reduces MET phosphorylation, in contrast to treatment with CoCl₂ or hydralazine. Differences between the states induced by low oxygen pressure and by CoCl₂ treatment have already been described. For instance, oxygen deprivation has been shown to strongly inhibit protein synthesis, while CoCl₂ has the opposite effect (Nakayama et al., 2000; Tinton et al., 1997). CoCl₂ and hydralazine are believed to mimic hypoxia mainly through HIF1a stabilization, as these agents prevent hydroxylation of some HIF1a proline residues by oxygen-dependent PHDs. These prolyl-hydroxylations are required under normoxic conditions to allow HIF1a ubiquitinylation by VHL and to promote its constitutive degradation (Epstein et al., 2001; Hoenig et al., 2008; Knowles et al., 2004).

The fact that hypoxia leads to reduced MET phosphorylation in all the cell lines and primary cells tested suggests that this effect is general. We show that hypoxia does not merely shift MET activation, since MET phosphorylation remains at a reduced level for all times of HGF/SF treatment. In HGF/SF-stimulated cells, furthermore, modulation of the MET phosphorylation level appears dynamic and reversible, since the level drops after just a few minutes of incubation at low oxygen pressure and rises rapidly to a level typical of normoxia when the oxygen pressure is restored to a normal level.

The hypoxia-triggered decrease in MET phosphorylation concerns several tyrosine residues. Notably affected are the adjacent tyrosines 1234 and 1235, required for kinase domain activation. Other tyrosine residues whose phosphorylation relies on MET kinase activity are also less phosphorylated, particularly tyrosine 1003, required for E3 ubiquitin ligase CBL recruitment and subsequent internalization and degradation of the MET receptor. Consistently, MET receptor internalization upon activation with a monoclonal anti-MET antibody is reduced under hypoxia. Also drastically reduced is phosphorylation of tyrosine 1349, in the C-terminal docking site. This effect is accompanied by reduced phosphorylation of the multi-adaptor protein GAB1, known to be recruited to this docking site.

Despite reduced MET and GAB1 phosphorylation, activation of the AKT and ERK downstream signaling kinases is maintained or even increased, depending on the cell type. These results are consistent with those of a previous study demonstrating efficient ERK activation by ligand-stimulated MET under hypoxic conditions (Lee et al., 2014). The same study also mentioned, however, a decrease in AKT activation that was not observed here. We further demonstrate in the present study that even under

hypoxia, activation of AKT and ERK still depends on MET activation and GAB1 adaptor recruitment, since MET or GAB1 knockdown with specific siRNAs effectively inhibits HGF/SF-triggered ERK and AKT activation, and since phosphorylation of both downstream kinases is markedly inhibited in the presence of a MET-targeting TKI at optimal dosage.

Just in case commercial recombinant HGF/SF might fail to bind to MET under hypoxia, we have treated cells with natural HGF/SF produced by fibroblasts and also with a potent semisynthetic MET agonist, K1B/S(Simonneau et al., 2015). Under hypoxia, in contrast to normoxia, these proteins proved unable to promote a normal level of MET phosphorylation. Importantly, reduced MET phosphorylation under hypoxia was also observed in cell lines where MET activation is ligand independent (either because of *met* gene amplification leading to massive overexpression or because of deletion of the regulatory exon 14).

Hypoxia has previously been shown to increase *met* gene expression as a consequence of HIF1 α transcription factor stabilization(Hayashi et al., 2005; Ide et al., 2006; Pennacchietti et al., 2003). We have observed no significant increase in the MET mRNA (data not shown) or protein level after 1 to 24 h of hypoxia. However, the expression level might vary in some cell types or if treatment is prolonged. In addition, although we have observed no change in the MET protein level, the reduced internalization evidenced under hypoxia could lead to decreased MET degradation.

HGF/SF-MET signaling induces a broad range of cellular responses, such as morphogenesis, scattering, migration, and cell survival(Furlan et al., 2014; Skead and Govender, 2015). Consistently with normal activation of downstream signaling events, all these biological responses appear to be maintained under hypoxia. These results suggest that minimal activation of MET and GAB1 under hypoxia is sufficient to promote full responses. This sensitivity might be due to signal amplification occurring downstream from GAB1 but upstream from ERK and AKT.

Phosphatases are well-known downregulators of kinase phosphorylation and activation. Several phosphatases, including Shp-2, DEP-1, and PTP1B, are known to either dephosphorylate MET or regulate its signaling (Maroun et al., 2000; Palka et al., 2003; Sangwan et al., 2008). In keeping with a dynamic, reversible modulatory mechanism, we propose that the decreased MET phosphorylation level observed during hypoxia could be the consequence of phosphatase activation. We have accordingly found the general tyrosine phosphatase inhibitor sodium orthovanadate to promote a high level of phosphorylated MET under both normoxic and hypoxic conditions. This supports the view that phosphatase activity plays a major role in regulating the MET phosphorylation status under hypoxia. Previous reports, however, suggest that the activity of the Shp-2 and DEP-1 phosphatases, among other phosphatases including PTP1B and T-cell PTP, is downregulated under hypoxia (ten Freyhaus et al., 2011). The fact that we have found inhibition of Shp-2 and DEP-1 not to restore the MET phosphorylation level suggests that they are not involved in its hypoxia-triggered decrease. It would therefore now be interesting to evaluate the involvement of novel phosphatases whose activity might be increased by hypoxia.

There is now clear evidence that tumoral hypoxia induces a complex adaptive response leading notably to resistance to therapy. These responses result from a profound genetic reprogramming mainly involving the transcriptional regulator HIF1 α . For instance, hypoxia upregulates expression of the multidrug resistance gene MDR1, causing efflux of chemotherapeutic drugs. It can also exert on cells

selective pressure for the loss of p53(Comerford et al., 2002; Graeber et al., 1996). Hypoxia-induced resistance to classical chemotherapeutic agents such as cisplatin or doxorubicin also requires transcriptional regulation, involving HIF1a or not(Doktorova et al., 2015). Prior to this work, resistance under hypoxia has not been described as an immediate mechanism, since it appeared to require at least transcriptional regulation.

Numerous strategies for inhibiting RTK activity are under development or already used clinically in cancer treatment. Many TKIs are ATP mimetics which associate with and block the ATP-binding site of the kinase domain. Paradoxically, ATP mimetics are more effective when the kinase catalytic site is in its open conformation, i. e., in its active state(Chen, 2011). For instance, EGFR-targeting TKIs such as gefitinib are more effective against EGFR variants with activating mutations. For example, direct binding measurements show that gefitinib binds 20 times more tightly to the L858R mutant than to the wild-type enzyme(Yun et al., 2007). Regarding the MET receptor, high sensitivity to MET inhibition appears associated with the high phospho-MET levels observed in HGF/SF autocrine cell lines(Xie et al., 2012).

Reasoning that the strong decrease in phosphorylated MET observed under hypoxia might modify cellular responses to TKIs, we have found that it takes a two- to six-fold-higher dose of the ATP mimetic PHA-665752 or SU-11274 under hypoxia than under normoxia to substantially reduce HGF/SF-triggered phosphorylation of the downstream kinases ERK and AKT. Likewise, although PHA-665752 treatment can abolish cell morphogenesis under normoxia, the same treatment induces only partial inhibition under hypoxia. Interestingly, re-oxygenation restores the response to the inhibitor. This demonstrates that, like the decrease in MET phosphorylation, resistance to MET-targeting TKIs is reversible.

Recently, several MET-targeting TKIs have been used successfully in clinical trials on patients with MET deregulations such as *met* gene amplification and activating mutations leading to exon 14 skipping(Frampton et al., 2015; Ou et al., 2011; Paik et al., 2015). Interestingly, we have evidenced decreased MET phosphorylation under hypoxia in cells displaying both of these defects. This suggests that resistance to TKIs could occur in the hypoxic areas of tumors harboring these MET deregulations, thereby possibly reducing the effectiveness of these agents.

Experimental procedures

Cell culture, cytokines, and drugs

The cell lines HT1080, HS746T, HeLa, HepG2, and GTL16 were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco® Life Technologies®) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco® Life Technologies®). MDCK cells were maintained in DMEM with 1% Non-Essential Amino Acids (NEAA, Life Technologies®) and 50 µg/mL biotin (Calbiochem®) supplemented with 10% FBS. EBC-1 cells were cultured in Minimum Essential Medium (MEM, Gibco® Life Technologies®) supplemented with 10% FBS. MCF10A cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12 (1:1), Gibco® Life Technologies®) with 20 ng/mL human recombinant Epidermal Growth Factor (Peprotech®), 100 ng/mL cholera toxin (Calbiochem®), 0.01 mg/mL insulin (Sigma Aldrich®), 500 ng/mL hydrocortisone (Calbiochem®) supplemented with 5% horse serum (Life Technologies®). All media were supplemented with 1% Zell Shield™ (Minerva Biolabs®). Keratinocytes were maintained in KGM-Gold™ Bullekit™ (Lonza®) supplemented with 0.4% BPE (Bovine Pituitary Extract), 0.5 ng/mL hEGF, 5 mg/mL rh Insulin, 100 ng/mL hydrocortisone, GA-1000 (gentamicin, amphotericin B), 1 mM epinephrine, 5 mg/mL transferrin (Lonza®).

Cells were cultured in an InVivo2 500™ Awel® station in a stable hypoxic environment (1% O₂) (94% N₂, 5% CO₂, 37°C, 75% humidity) or under normoxia (at 37°C in a water-saturated atmosphere containing 5% CO₂ and 21% O₂).

Recombinant human HGF/SF was purchased from Peprotech® (Rocky Hill, CT, USA), anisomycin from Santa Cruz®. PHA-665752 from Promega® (Madison, WI, USA), and SU-11274 from Calbiochem®. Mitomycin-c, DMSO, CoCl₂, hydralazine, and Na₃VO₄ were purchased from Sigma® (St Louis, MO, USA).

Western blotting and antibodies

Cells were cultured in 6-well plates in their respective media and then starved overnight in serum-free medium. They were then lysed with 100 µL RIPA buffer (20 mM HEPES, 1% NP40, 0.1% SDS, 5% glycerol, 142 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7.45) supplemented with phosphatase inhibitors (1/200 Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 - Sigma® P5726) and protease inhibitors (1/400 Protease Inhibitor Cocktail - Sigma® P1860). For analysis, lysates were centrifuged and the supernatant collected. The total protein concentration was determined with the BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce®), and equal amounts of proteins were resolved on NuPAGE 4-12% Bis-Tris gels (Novex® by Life Technologies™). Separated proteins were transferred onto a polyvinyl difluoride membrane in Towbin buffer (10% methanol, 10% Tris-glycine 1X, 0.0025% SDS). The membrane was then equilibrated in blocking buffer (8 g casein/1L, PBS 1X, 0.2% Tween). Proteins were analyzed by western blotting with anti-phosphorylated MET at 1/1000 dilution from stock solution (Tyr 1234/1235, #3077 - Cell Signaling® ; Tyr 1003, #44-882 Biosource™ Life Technologies® ; Tyr 1349, #3121 - Cell Signaling®), anti-MET (3D4 - Life Technologies®), anti-phosphorylated-AKT (Ser473, #9271 - Cell Signaling®), anti-AKT (Cell Signaling®), anti-phosphorylated-ERK (Thr202/Tyr204, #9106 - Cell Signaling®), anti-ERK2 (C14 - Santa Cruz®), anti-phosphorylated-GAB1 (Millipore™), anti-GAB1 (#1626-1 - Epitomics®), anti-phosphotyrosines (4G10 - Millipore™), anti-HIF1a (Novus biologicals®), and anti-carbonic anhydrase IX

(CAIX – Abcam®). After incubation with the appropriate species-specific horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies (anti-rabbit (#711-035-15), mouse (#115-035-146), or goat (#705-035-003) – Jackson ImmunoResearch Lab®), the antigen-antibody complexes were detected with a light-sensitive photographic film (CL-Xposure™ Film – Thermo Scientific®) after use of an ECL kit (Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents), West Dura Extended Duration Substrate (SuperSignal®), or SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoScientific®) as required. For quantification of MET phosphorylation, luminescence was captured by digital imaging with a cooled charge coupled device camera (LAS 3000, Fuji, Tokyo, Japan), and quantification was performed with Multigauge V3.0 software. The background-adjusted volume was normalized with respect to an empty well.

Transfections and RNA interference

Cells were transfected with different siRNAs targeting MET or GAB1. Three MET-targeting siRNAs or two GAB1-targeting siRNAs were used as a pool or separately. Transfection was performed according to the reverse transfection protocol. A suspension of 400,000 cells was incubated for 20 minutes with a mix of 4.5 µL Lipofectamine 2000 (Invitrogen®) and 20 nM MET- or GAB1-targeting siRNA and then plated in a 6-well plate in a final volume of 1.5 mL complete medium. The MET-targeting siRNAs were Stealth siRNAs (Invitrogen®) [5'-CCAUUUCAACUGAGUUUGCUGUUA-3', 5'-UCCAGAAGAUCAGUUUCCUAAUUCA-3', and 5'CCGAGGGAAUCAUCAUGAAAAGAUUU-3']. The GAB1-targeting siRNAs were stealth siRNA (Invitrogen®) 5'-GAGAGUGGAUUAUGUUGUU-3' and GAB1 siRNA HSS103902 – chr4 : 144257983 – 144395718). A negative control Stealth siRNA was also used (Invitrogen®). After adhesion, the medium was renewed, first with complete medium and then with serum-free medium 24 hours later. The next day, cells were placed under normoxic or hypoxic conditions for the indicated time and then stimulated or not with 10 ng/mL HGF/SF for 10 minutes.

Tumor analysis and immunohistochemistry

All experiments with mice were performed according to international ethical guidelines. GTL16 gastric cancer cells in 200 µL PBS were injected subcutaneously ($5 \cdot 10^6$ cells/injection) into the posterior flanks of nine-week-old female SCID mice. After 17 days, the mice were sacrificed. Their tumors were excised and then formaldehyde-fixed (4%) and paraffin-embedded (FFPE). For immunohistochemistry, 7-µm-thick sections were prepared and IHC was performed with antibodies against the intracellular domain of MET (SP44 CONFIRM, Ventana Medical Systems, Roche®), the phosphorylated form of MET (Tyr 1234/1235 – #3077/D26 – Cell Signaling®), or CAIX (NCL-L-CAIX - Novocastra™) in a Ventana automated instrument (Benchmark XT Ventana instrument).

Cellular responses

For the migration assay, MDCK cells were seeded (30,000 cells/well) into an IBIDI® insert. The next day, DMEM with 10% FBS was added to the well with 10 µg/mL mitomycin-c to prevent proliferation. Approximately one hour later, cells were photographed and the medium was removed and

replaced with DMEM, 10% FBS and the cells were left overnight under normoxic or hypoxic conditions. The next day, the experiment was stopped and the cells were photographed.

For the morphogenesis assay, MDCK cells were seeded (100,000 cells/well) onto a 300 μ L layer of Matrigel™ in a 24-well plate and incubated overnight. The next day, 10 ng/mL HGF/SF was added to the medium and the cells were placed under normoxic or hypoxic conditions for another 24 hours. Finally they were photographed.

For the scattering assay, MDCK cells were seeded (2,500 cells/well) into a 12-well plate in medium with 10% FBS. The next day, and after adhesion, the medium was removed and the cells were serum-starved and HGF/SF was added or not (final concentration: 10 ng/mL). The cells were then incubated under normoxic or hypoxic conditions for 24 hours, fixed, stained with hematoxylin and eosin; and photographed.

For the survival assay, MDCK cells were seeded (at 250,000 cells/well) into a 6-well plate. After adhesion, they were serum-starved for 24 hours before addition of DMEM alone or DMEM containing anisomycin (0.7 μ M), HGF/SF (25 ng/mL), or both. The next day, the cells were trypsinized and then analyzed with the Tali® Apoptosis Kit (Life Technologies®). Briefly, cells were harvested by centrifugation and incubated with Alexa Fluor 488-conjugated annexin V and propidium iodide. The staining intensity was then measured with a Tali® Image-Based Cytometer (Life Technologies®) to determine numbers of unstained, singly stained, and doubly stained cells (only data with PI staining are shown).

Immunofluorescence

Cells were placed on ice and pretreated for at least 30 min with the anti-MET antibody 5D5 (hybridoma ATCC® HB-11895TM) or a control IgG, placed at 37°C for the indicated time, and then stained with PBS, fixed with 4% PFA, and permeabilized with PBS/Triton (0.1%) before staining with an FITC-conjugated anti-mouse IgG. Coverslips were mounted with Glycergel (DakoCytomation®) mounting medium and fluorescence was measured with a Zeiss AxioImager Z1 Apotome (Thornwood, NY)

Quantification of phospho-AKT and phospho-ERK with AlphaScreen®

Measurements were performed in 384-well plates according to the manufacturer's protocols (OptiPlate™-384, PerkinElmer®, CA, USA). Briefly, 12000 cells were seeded into 96-well culture plates for 24 hours and starved overnight. The next day, the plates were placed under normoxic and hypoxic conditions for 1.5 h or under hypoxic conditions for 1.5 h then reoxygenated for 10 minutes, and the cells treated or not with HGF/SF, PHA-665752, or both at the indicated concentration(s). The cells were then immediately lysed in the manufacturer's buffer supplemented with phosphatase inhibitors (1/200 Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 – Sigma® P5726) and protease inhibitors (1/400 Protease Inhibitor Cocktail – Sigma® P1860). The lysates were transferred to a 384-well microplate and an appropriate reaction buffer added for detection of phosphorylated AKT (TGRA4S500) or ERK (TGRES500). The Alpha signal was measured on an EnSpire plate reader, with standard AlphaScreen® settings (PerkinElmer®).

The authors declare that there are no conflicts of interest

Acknowledgments

This work was supported by the CNRS, the Pasteur Institute of 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 and the Chemistry Systems Biology (CSB) facility for access to instruments and technical advice. We also thank Dr Samuel Meignan for helpful comments on the use of a hypoxia station and Dr Corine Abbadie and Dr Nathalie Martin for providing primary keratinocyte cells.

References

- 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* *13*, 1261-1272.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., and Vande Woude, G. F. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nature reviews Molecular cell biology* *4*, 915-925.
- Birchmeier, C., and Gherardi, E. (1998). Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends in cell biology* *8*, 404-410.
- Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* *411*, 355-365.
- Blumenschein, G. R., Jr., Mills, G. B., and Gonzalez-Angulo, A. M. (2012). Targeting the hepatocyte growth factor-cMET axis in cancer therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *30*, 3287-3296.
- Boccaccio, C., and Comoglio, P. M. (2006). Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nature reviews Cancer* *6*, 637-645.
- Bottaro, D. P., and Liotta, L. A. (2003). Cancer: Out of air is not out of action. *Nature* *423*, 593-595.
- Brahimi-Horn, M. C., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2007a). Hypoxia and cancer. *J Mol Med (Berl)* *85*, 1301-1307.
- Brahimi-Horn, M. C., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2007b). Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Current opinion in cell biology* *19*, 223-229.
- Brahimi-Horn, M. C., and Pouyssegur, J. (2007). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS letters* *581*, 3582-3591.
- 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 research* *70*, 7580-7590.
- Chan, D. A., Sutphin, P. D., Denko, N. C., and Giaccia, A. J. (2002). Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1 α . *The Journal of biological chemistry* *277*, 40112-40117.
- Chen, Y.-f. L.-w. F. (2011). Mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B* *1*, 197-207.
- Comerford, K. M., Wallace, T. J., Karhausen, J., Louis, N. A., Montalto, M. C., and Colgan, S. P. (2002). Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer research* *62*, 3387-3394.
- Doktorova, H., Hrabeta, J., Khalil, M. A., and Eckschlager, T. (2015). Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: The role of not only HIF-1. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* *159*, 166-177.
- Dvorak, H. F., Nagy, J. A., Feng, D., Brown, L. F., and Dvorak, A. M. (1999). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Current topics in microbiology and immunology* *237*, 97-132.
- Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., *et al.* (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* *107*, 43-54.
- Frampton, G. M., Ali, S. M., Rosenzweig, M., Chmielecki, J., Lu, X., Bauer, T. M., Akimov, M., Bufill, J., Lee, C., Jentz, D., *et al.* (2015). Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer discovery*.
- Furlan, A., Kherrouche, Z., Montagne, R., Copin, M. C., and Tulasne, D. (2014). Thirty years of research on met receptor to move a biomarker from bench to bedside. *Cancer research* *74*, 6737-6744.
- Gherardi, E., Birchmeier, W., Birchmeier, C., and Vande Woude, G. (2012). Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nature reviews Cancer* *12*, 89-103.
- Gherardi, E., Gray, J., Stoker, M., Perryman, M., and Furlong, R. (1989). Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein that modulates epithelial interactions and movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *86*, 5844-5848.
- Go, H., Jeon, Y. K., Park, H. J., Sung, S. W., Seo, J. W., and Chung, D. H. (2010). High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* *5*, 305-313.
- Graeber, T. G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D. E., Koch, C. J., Lowe, S. W., and Giaccia, A. J. (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* *379*, 88-91.
- Hayashi, M., Sakata, M., Takeda, T., Tahara, M., Yamamoto, T., Okamoto, Y., Minekawa, R., Isobe, A., Ohmichi, M., Tasaka, K., and Murata, Y. (2005). Up-regulation of c-met protooncogene product expression

through hypoxia-inducible factor-1alpha is involved in trophoblast invasion under low-oxygen tension. *Endocrinology* 146, 4682-4689.

Hoening, M. R., Bianchi, C., and Sellke, F. W. (2008). Hypoxia inducible factor-1 alpha, endothelial progenitor cells, monocytes, cardiovascular risk, wound healing, cobalt and hydralazine: a unifying hypothesis. *Current drug targets* 9, 422-435.

Humphrey, P. A., Halabi, S., Picus, J., Sanford, B., Vogelzang, N. J., Small, E. J., and Kantoff, P. W. (2006). Prognostic significance of plasma scatter factor/hepatocyte growth factor levels in patients with metastatic hormone- refractory prostate cancer: results from cancer and leukemia group B 150005/9480. *Clinical genitourinary cancer* 4, 269-274.

Ide, T., Kitajima, Y., Miyoshi, A., Ohtsuka, T., Mitsuno, M., Ohtaka, K., Koga, Y., and Miyazaki, K. (2006). Tumor-stromal cell interaction under hypoxia increases the invasiveness of pancreatic cancer cells through the hepatocyte growth factor/c-Met pathway. *International journal of cancer Journal international du cancer* 119, 2750-2759.

Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., and Kaelin, W. G., Jr. (2001). HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* 292, 464-468.

Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., *et al.* (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.

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.

Knowles, H. J., Tian, Y. M., Mole, D. R., and Harris, A. L. (2004). Novel mechanism of action for hydralazine: induction of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by inhibition of prolyl hydroxylases. *Circulation research* 95, 162-169.

Krause, D. S., and Van Etten, R. A. (2005). Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *The New England journal of medicine* 353, 172-187.

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. *Oncology reports* 25, 1517-1524.

Lee, Y. H., Morrison, B. L., and Bottaro, D. P. (2014). Synergistic signaling of tumor cell invasiveness by hepatocyte growth factor and hypoxia. *The Journal of biological chemistry* 289, 20448-20461.

Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117-1134.

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. *Molecular and cellular biology* 20, 8513-8525.

Nakajima, M., Sawada, H., Yamada, Y., Watanabe, A., Tatsumi, M., Yamashita, J., Matsuda, M., Sakaguchi, T., Hirao, T., and Nakano, H. (1999). The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer* 85, 1894-1902.

Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., and Shimizu, S. (1989). Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342, 440-443.

Nakayama, M., Takahashi, K., Kitamuro, T., Yasumoto, K., Katayose, D., Shirato, K., Fujii-Kuriyama, Y., and Shibahara, S. (2000). Repression of heme oxygenase-1 by hypoxia in vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 271, 665-671.

Ou, S. H., 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. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6, 942-946.

Paik, P. K., Dilon, A., Fan, P. D., Yu, H., Rekhman, N., Ginsberg, M. S., Borsu, L., Schultz, N., Berger, M. F., Rudin, C. M., and Ladanyi, M. (2015). Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer discovery*.

Palka, H. L., Park, M., and Tonks, N. K. (2003). Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *The Journal of biological chemistry* 278, 5728-5735.

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

Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., 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.

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. *Molecular cell* 8, 995-1004.

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.

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.

Qi, J., McTigue, M. A., Rogers, A., Lifshits, E., Christensen, J. G., Janne, P. A., and Engelman, J. A. (2011). Multiple mutations and bypass mechanisms can contribute to development of acquired resistance to MET inhibitors. *Cancer research* 71, 1081-1091.

Rosario, M., and Birchmeier, W. (2003). How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends in cell biology* 13, 328-335.

Sachs, M., Weidner, K. M., Brinkmann, V., Walther, I., Obermeier, A., Ullrich, A., and Birchmeier, W. (1996). Motogenic and morphogenic activity of epithelial receptor tyrosine kinases. *The Journal of cell biology* 133, 1095-1107.

Sangwan, V., Paliouras, G. N., Abella, J. V., Dube, N., Monast, A., Tremblay, M. L., and Park, M. (2008). Regulation of the Met receptor-tyrosine kinase by the protein-tyrosine phosphatase 1B and T-cell phosphatase. *The Journal of biological chemistry* 283, 34374-34383.

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. *Nature genetics* 16, 68-73.

Schmidt, L., Junker, K., Nakaigawa, N., Kinjerski, T., Weirich, G., Miller, M., Lubensky, I., Neumann, H. P., Brauch, H., Decker, J., *et al.* (1999). Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene* 18, 2343-2350.

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359, 843-845.

Simonneau, C., Leclercq, B., Mougel, A., Adriaenssens, E., Paquet, C., Raibaut, L., Ollivier, N., Drobecq, H., Marcoux, J., Cianférani, S., *et al.* (2015). Semi-synthesis of a HGF/SF kringle one (K1) domain scaffold generates a potent in vivo MET receptor agonist. *Chemical Science* 6, 2110-2121.

Skead, G., and Govender, D. (2015). Gene of the month: MET. *Journal of clinical pathology* 68, 405-409.

Srinivasan, S., Chitalia, V., Meyer, R. D., Hartsough, E., Mehta, M., Harrold, I., Anderson, N., Feng, H., Smith, L. E., Jiang, Y., *et al.* (2015). Hypoxia-induced expression of phospho-tyrosine kinase 3 regulates expression of VEGFR-2 and promotes angiogenesis. *Angiogenesis*.

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.

Sullivan, R., and Graham, C. H. (2007). Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer metastasis reviews* 26, 319-331.

Taddei, M. L., Giannoni, E., Comito, G., and Chiarugi, P. (2013). Microenvironment and tumor cell plasticity: an easy way out. *Cancer letters* 341, 80-96.

ten Freyhaus, H., Dagnell, M., Leuchs, M., Vantler, M., Berghausen, E. M., Caglayan, E., Weissmann, N., Dahal, B. K., Schermuly, R. T., Ostman, A., *et al.* (2011). Hypoxia enhances platelet-derived growth factor signaling in the pulmonary vasculature by down-regulation of protein tyrosine phosphatases. *American journal of respiratory and critical care medicine* 183, 1092-1102.

Tinton, S., Tran-Nguyen, Q. N., and Buc-Calderon, P. (1997). Role of protein-phosphorylation events in the anoxia signal-transduction pathway leading to the inhibition of total protein synthesis in isolated hepatocytes. *European journal of biochemistry / FEBS* 249, 121-126.

Trusolino, L., Bertotti, A., and Comoglio, P. M. (2010). MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 834-848.

Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-212.

Wang, Y., and Ohh, M. (2010). Oxygen-mediated endocytosis in cancer. *Journal of cellular and molecular medicine* 14, 496-503.

Wilson, W. R., and Hay, M. P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 11, 393-410.

Xie, Q., Bradley, R., Kang, L., Koeman, J., Ascierto, M. L., Worschech, A., De Giorgi, V., Wang, E., Kefene, L., Su, Y., *et al.* (2012). Hepatocyte growth factor (HGF) autocrine activation predicts sensitivity to MET

inhibition in glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 570-575.

Yun, C. H., Boggan, T. J., Li, Y., Woo, M. S., Greulich, H., Meyerson, M., and Eck, M. J. (2007). Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer cell* *11*, 217-227.

Figures :

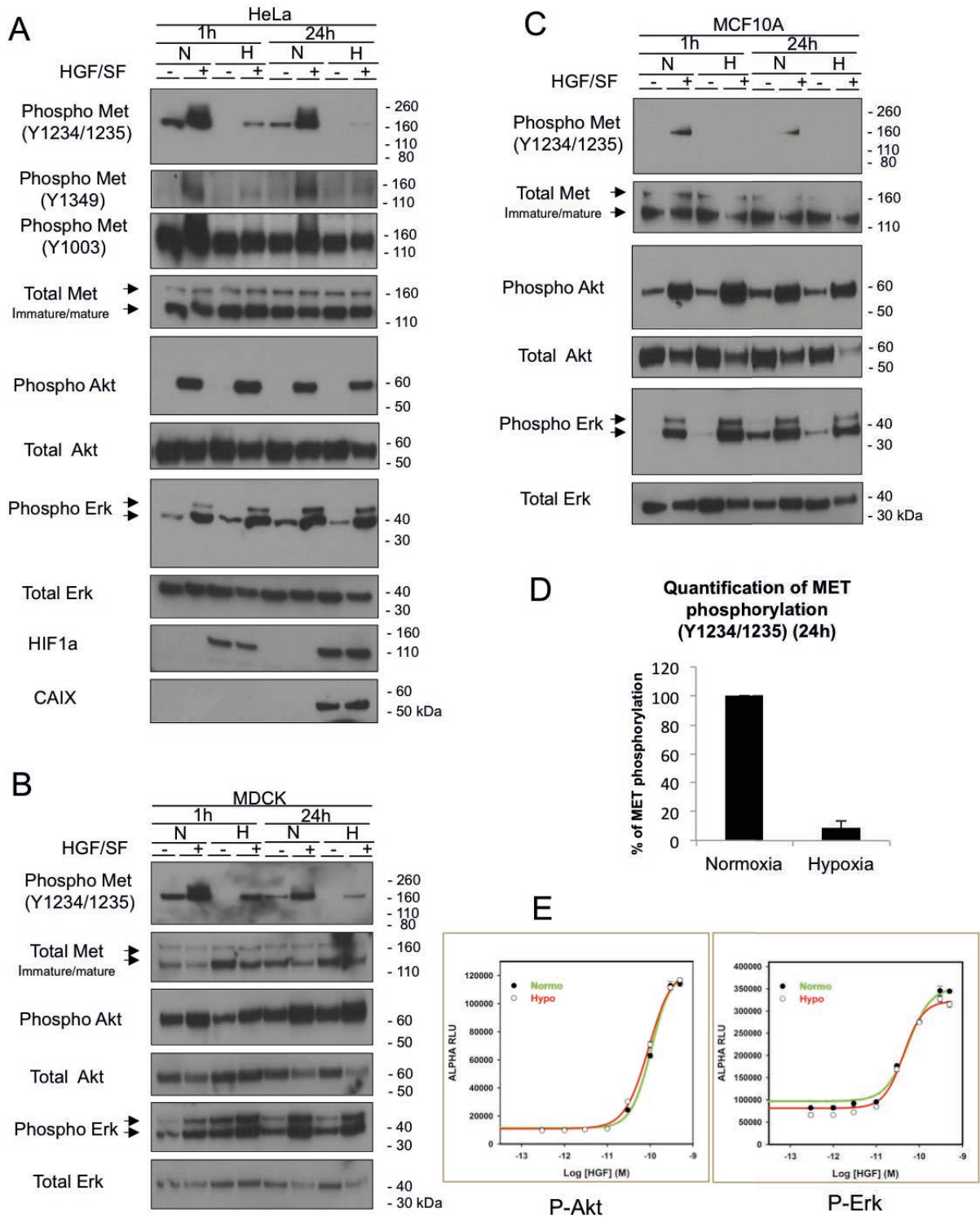
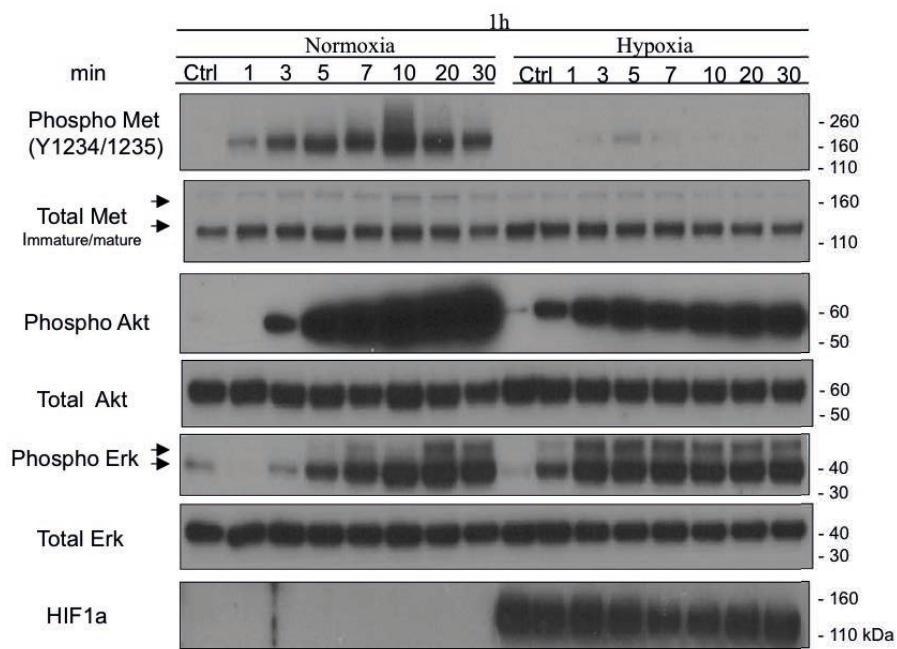


Fig. 1

A



B

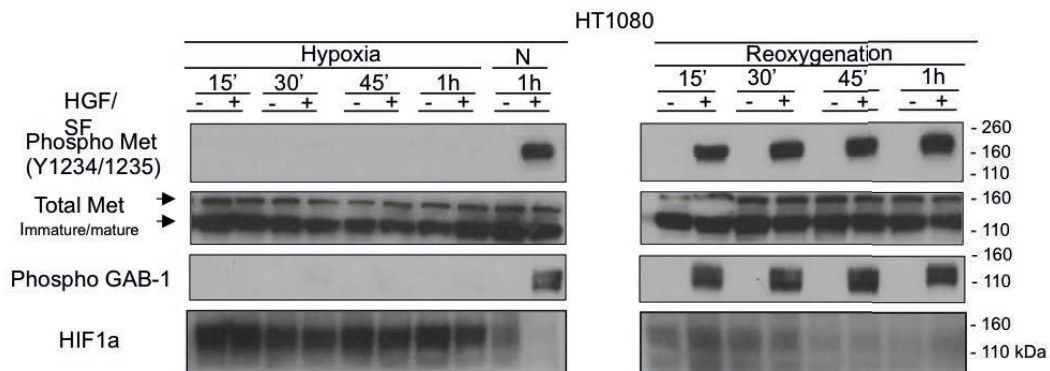


Fig. 2

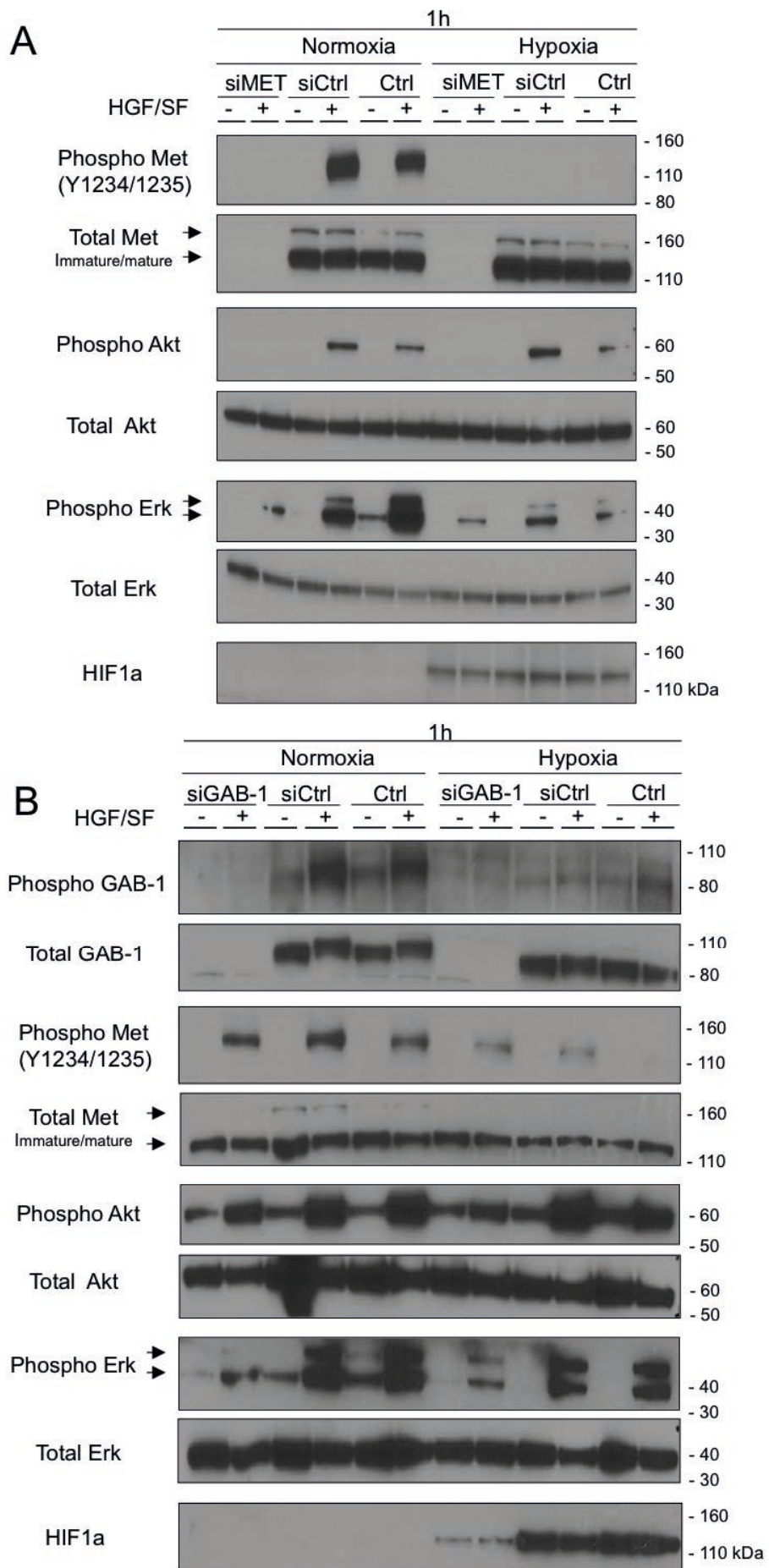


Fig. 3

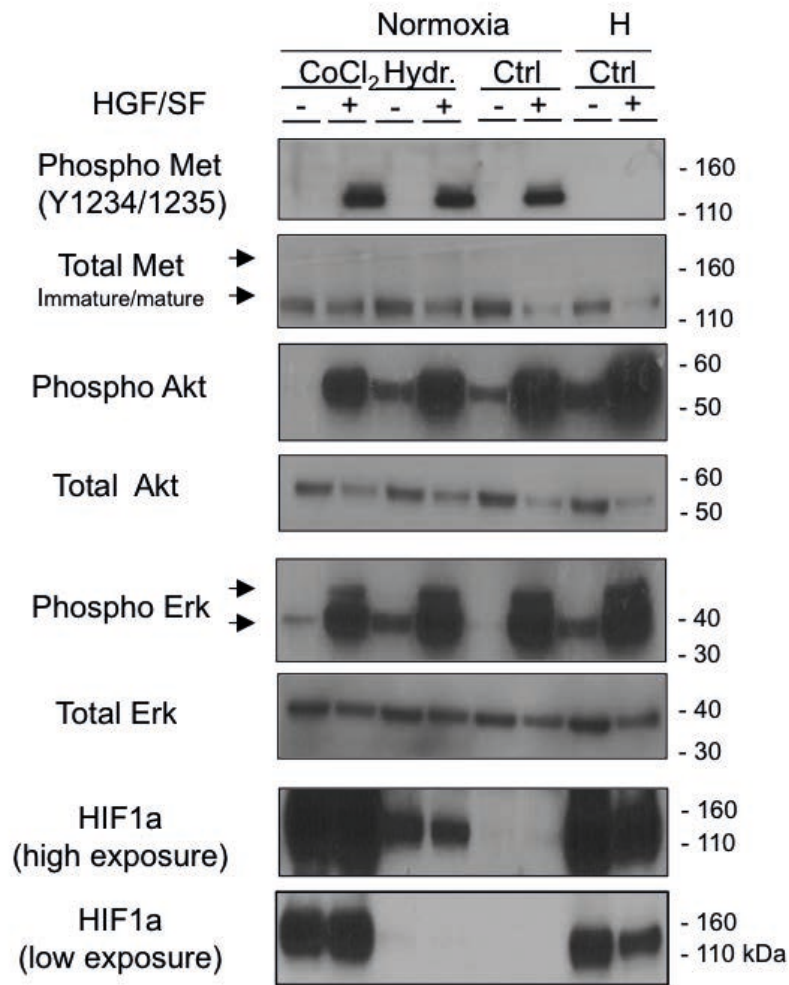


Fig. 4

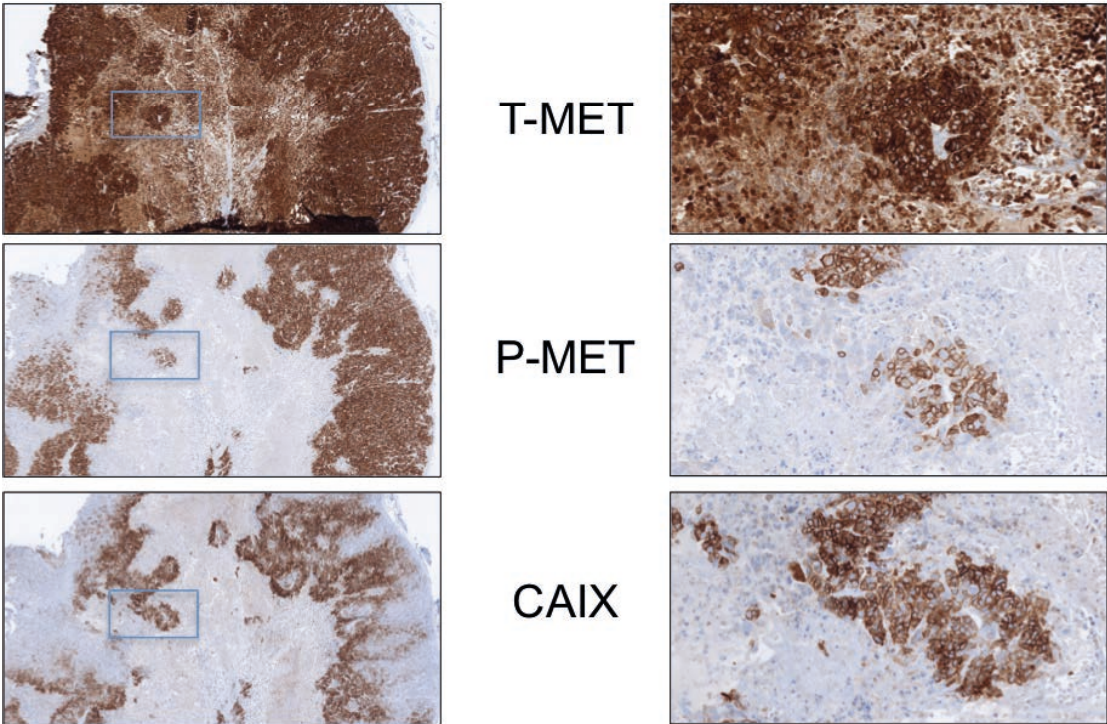
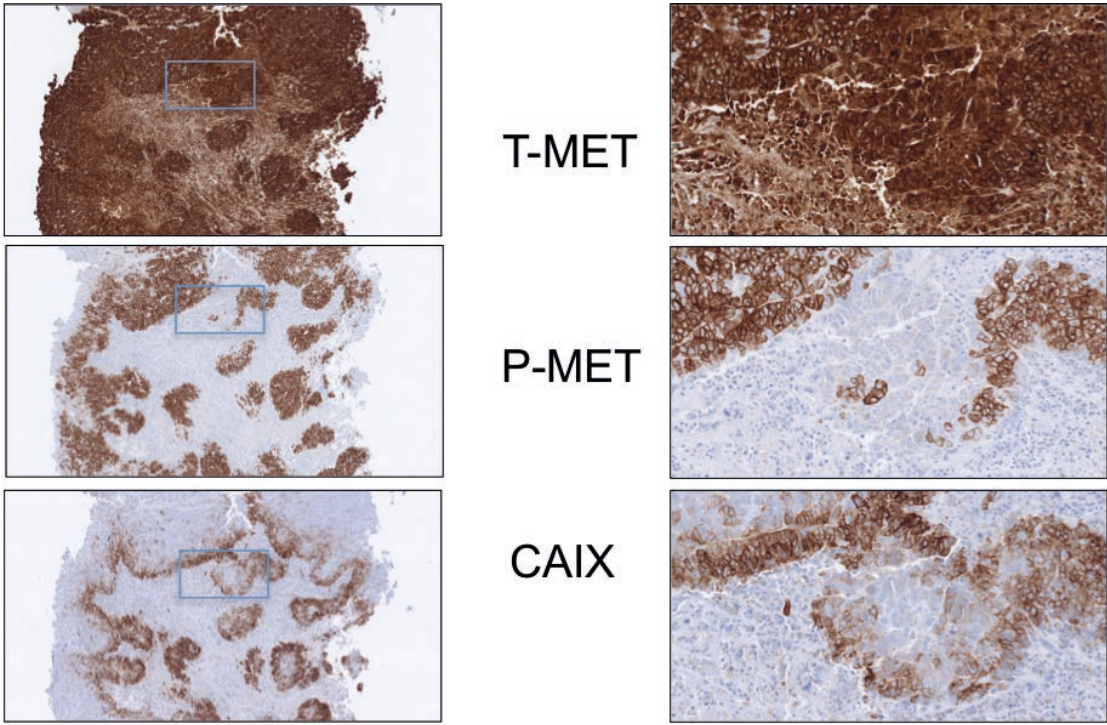


Fig. 5

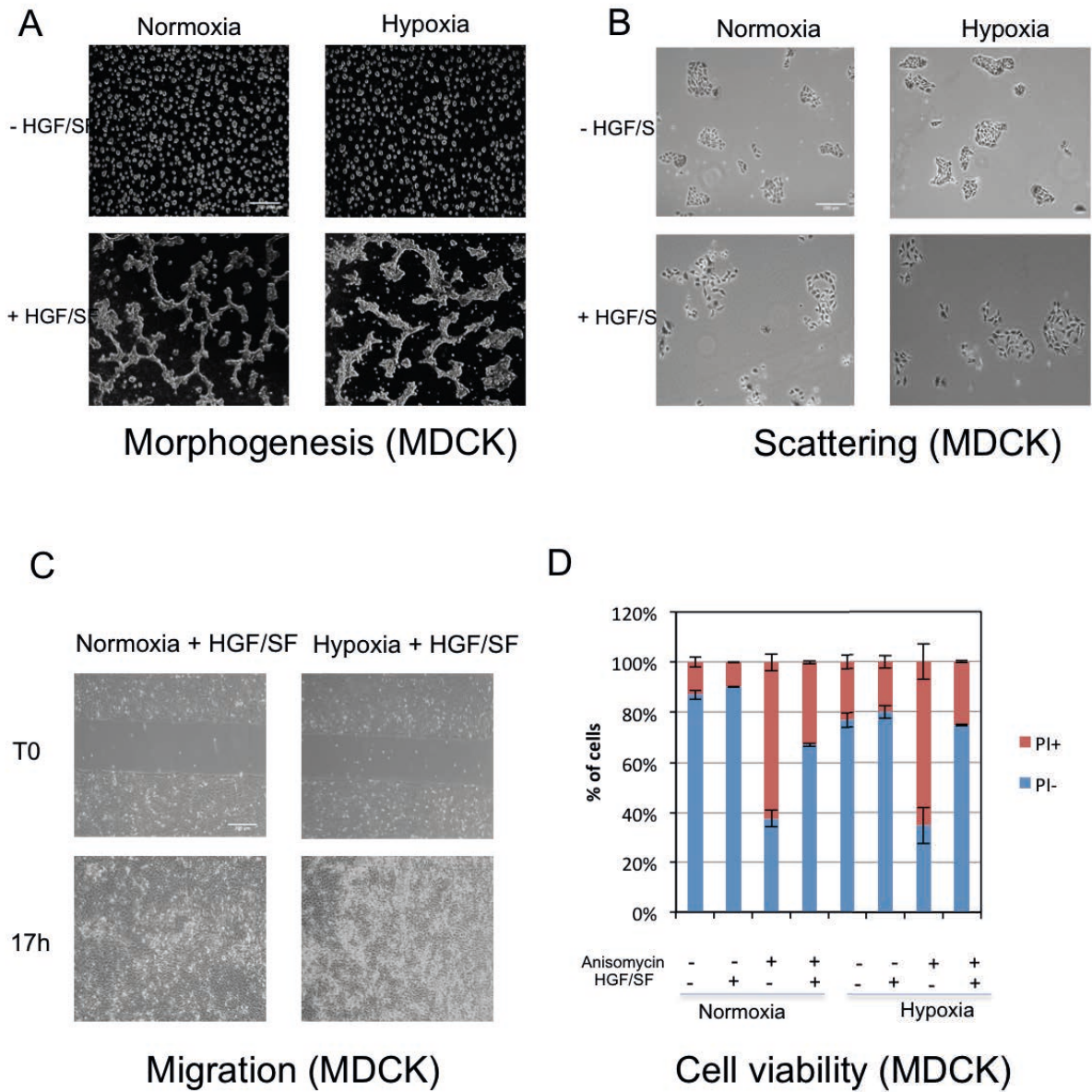
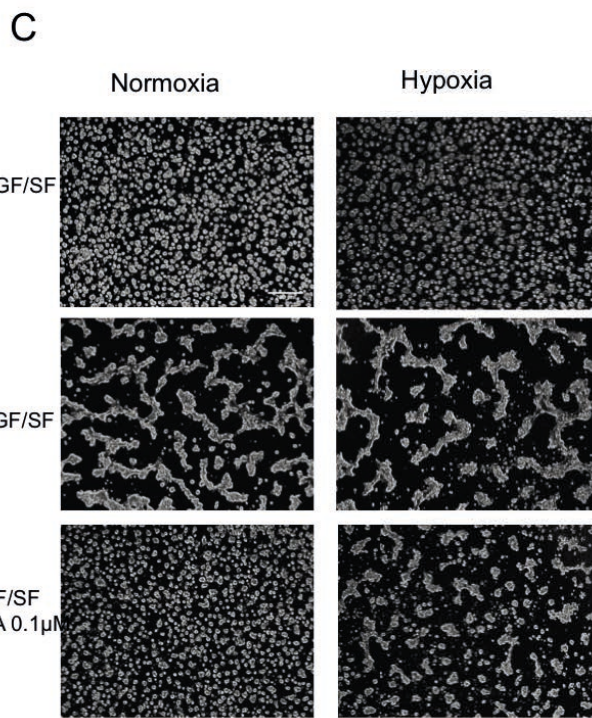
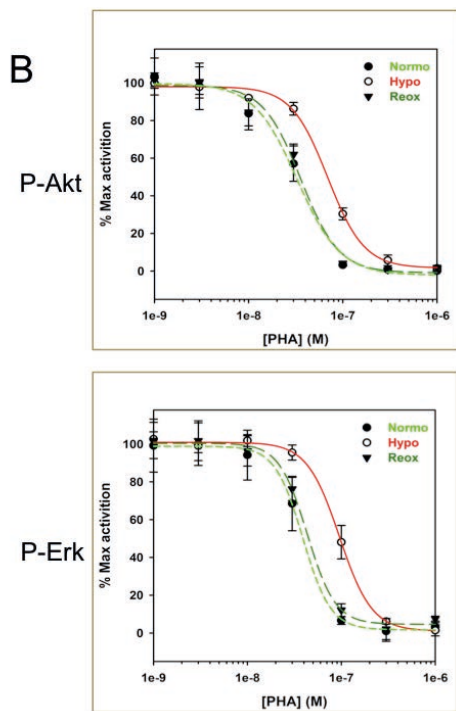
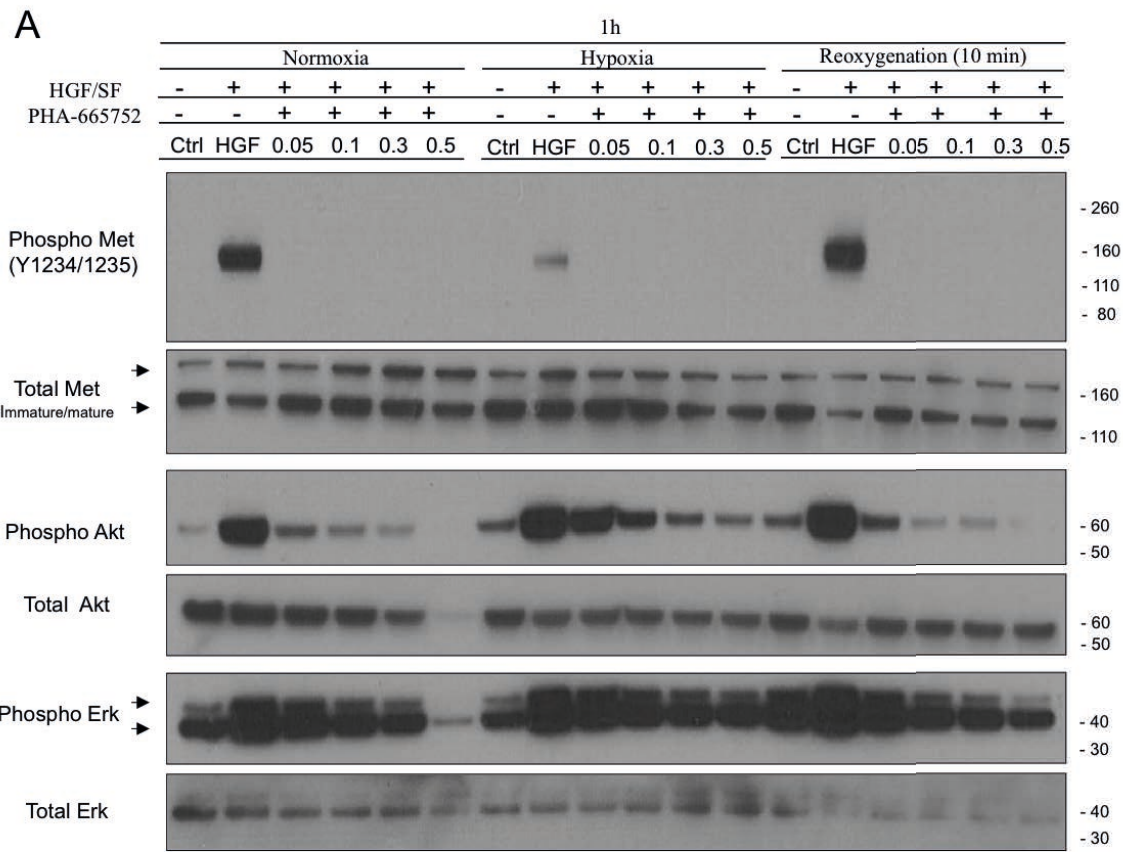
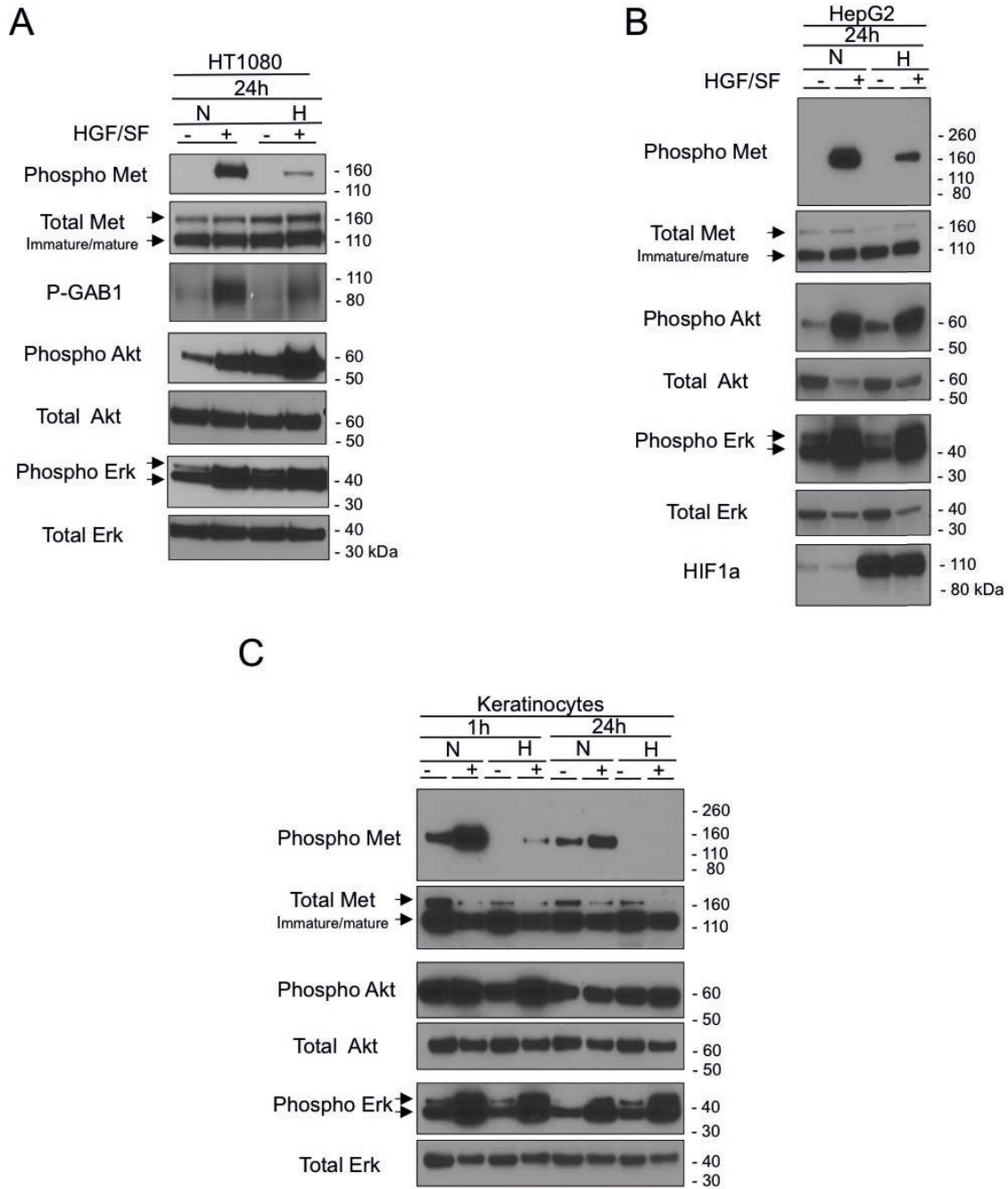


Fig. 6

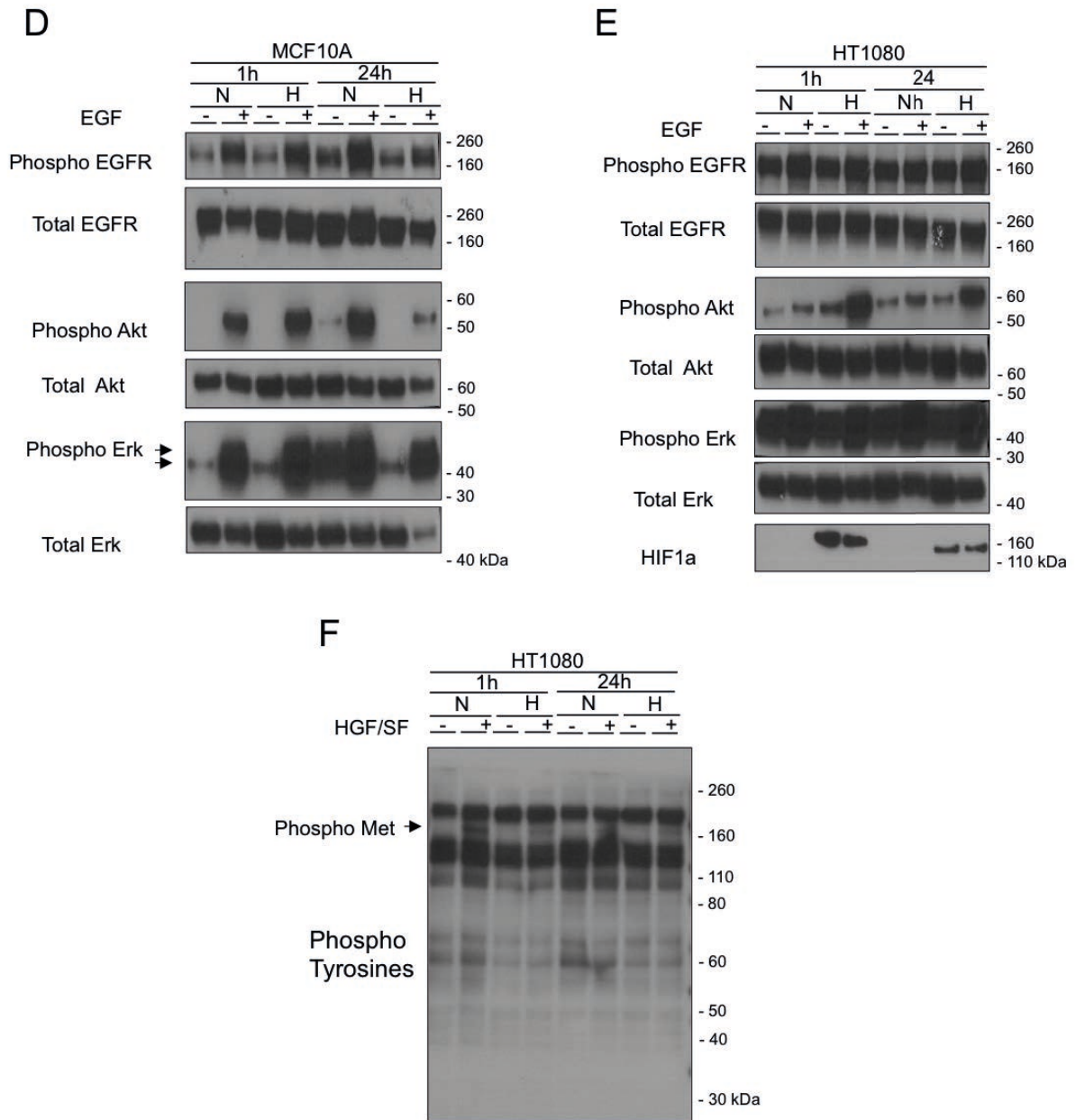


Morphogenesis (MDCK)

Fig. 7

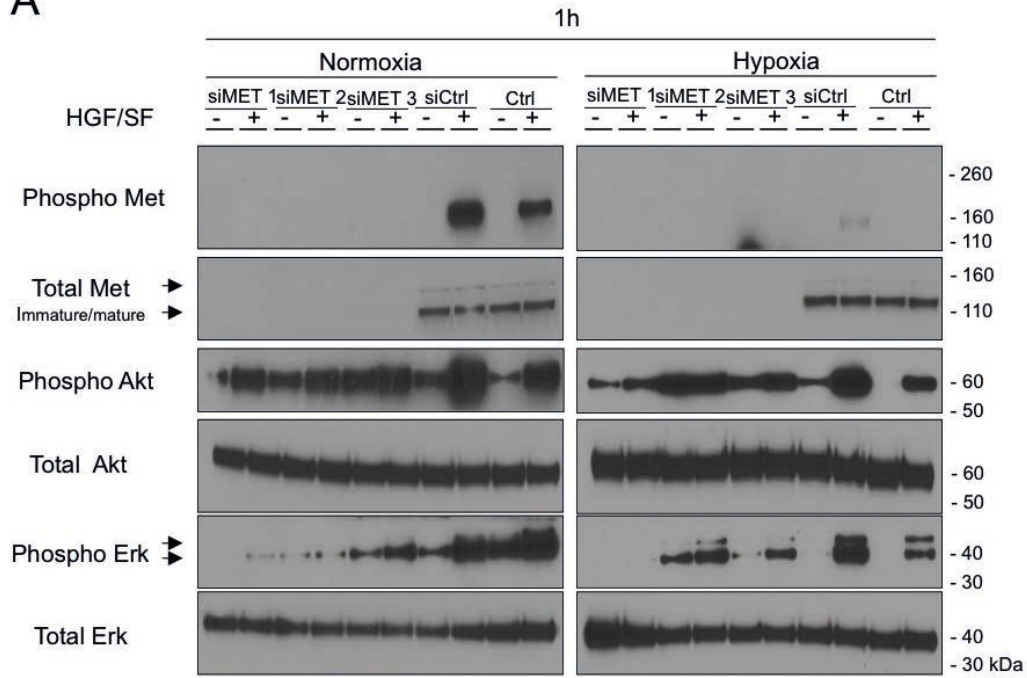


Supplementary Figure S 1

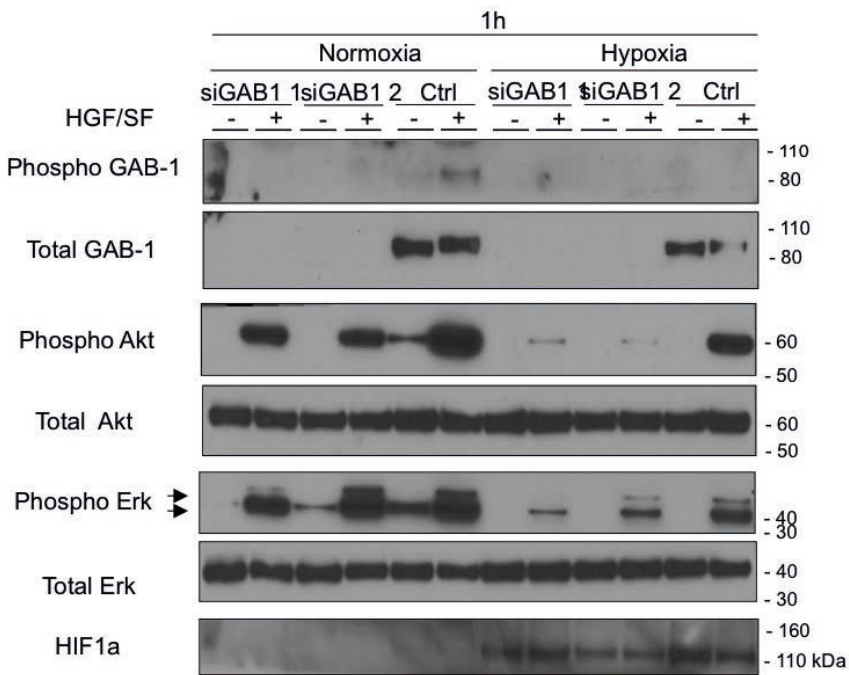


Supplementary Figure S 1

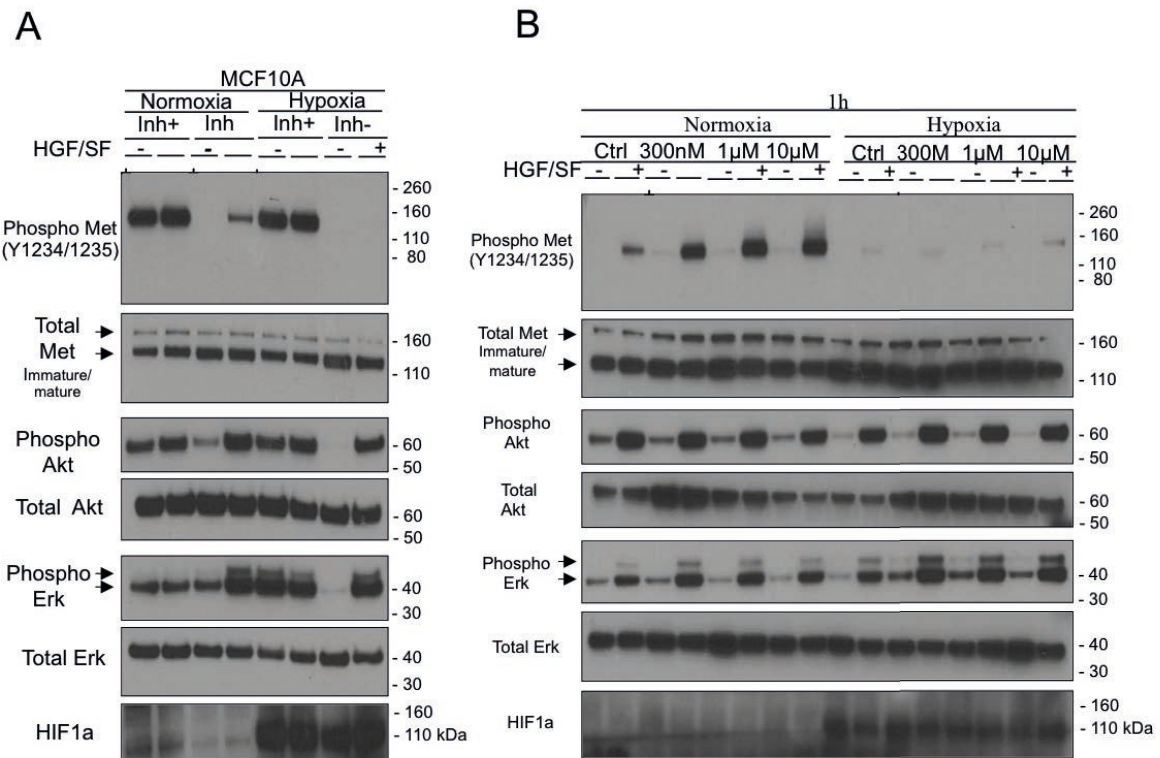
A



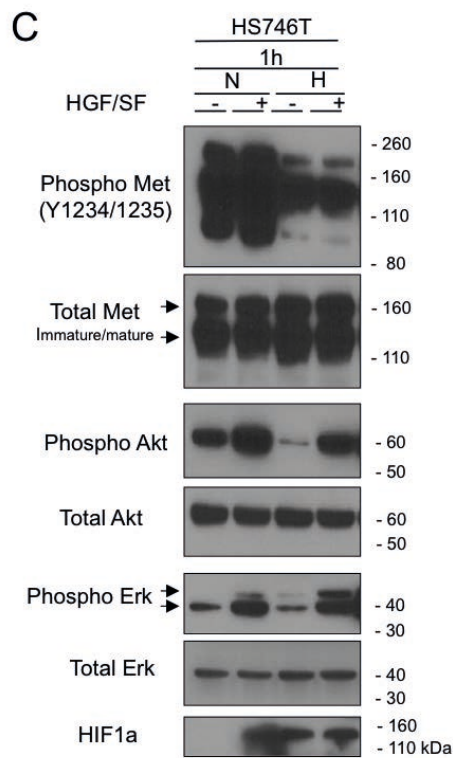
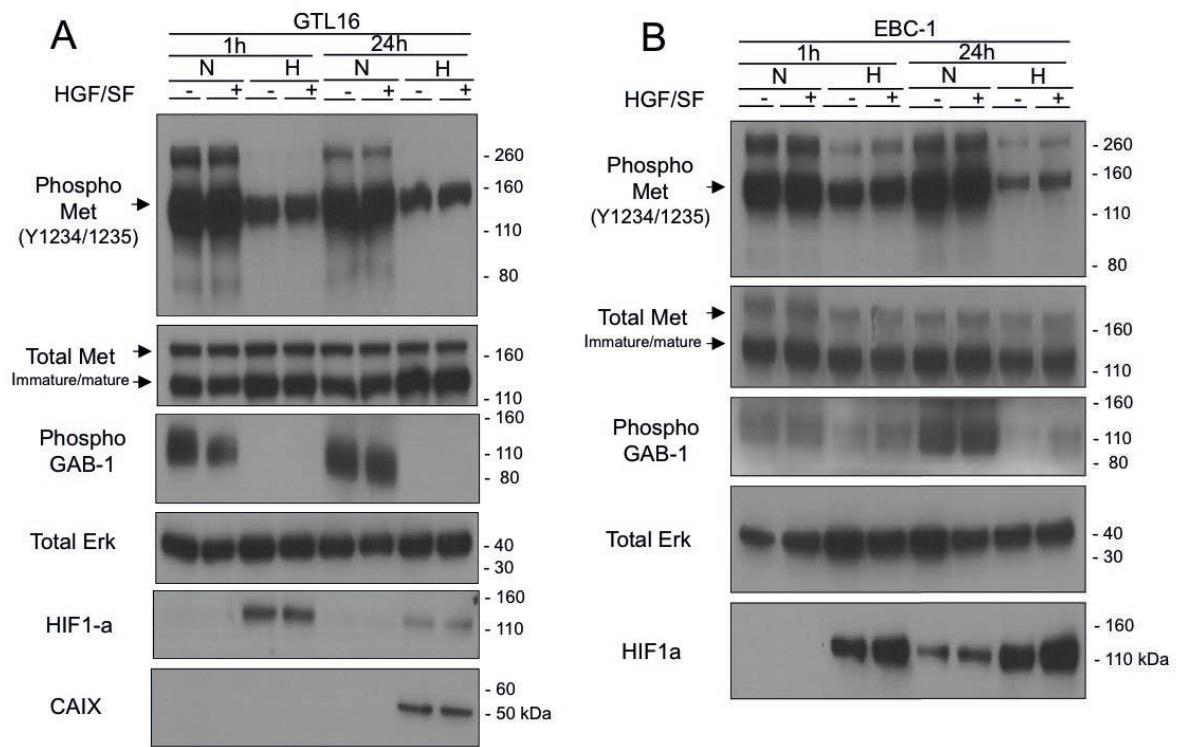
B



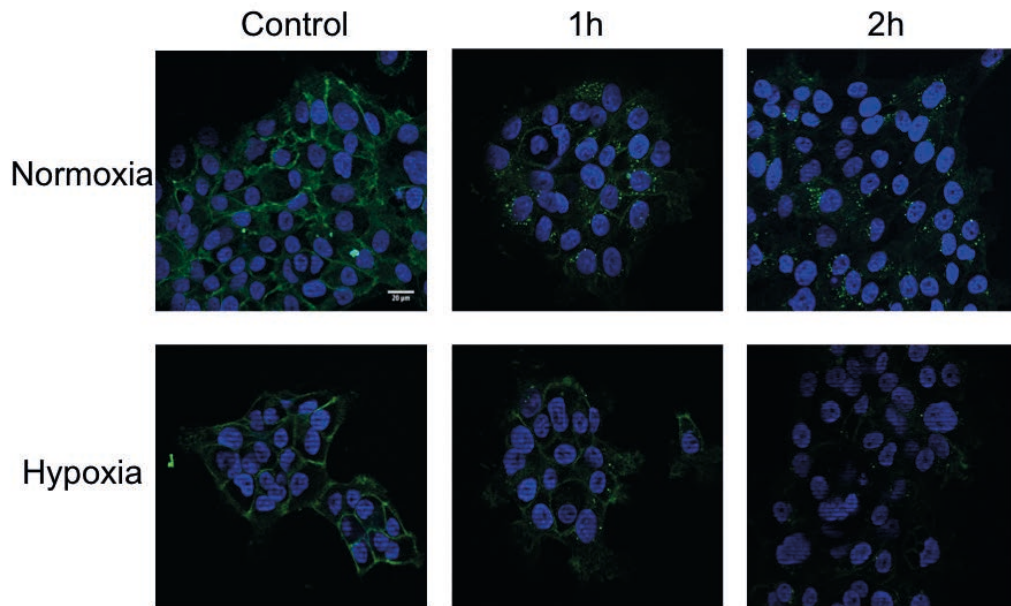
Supplementary Figure S 2



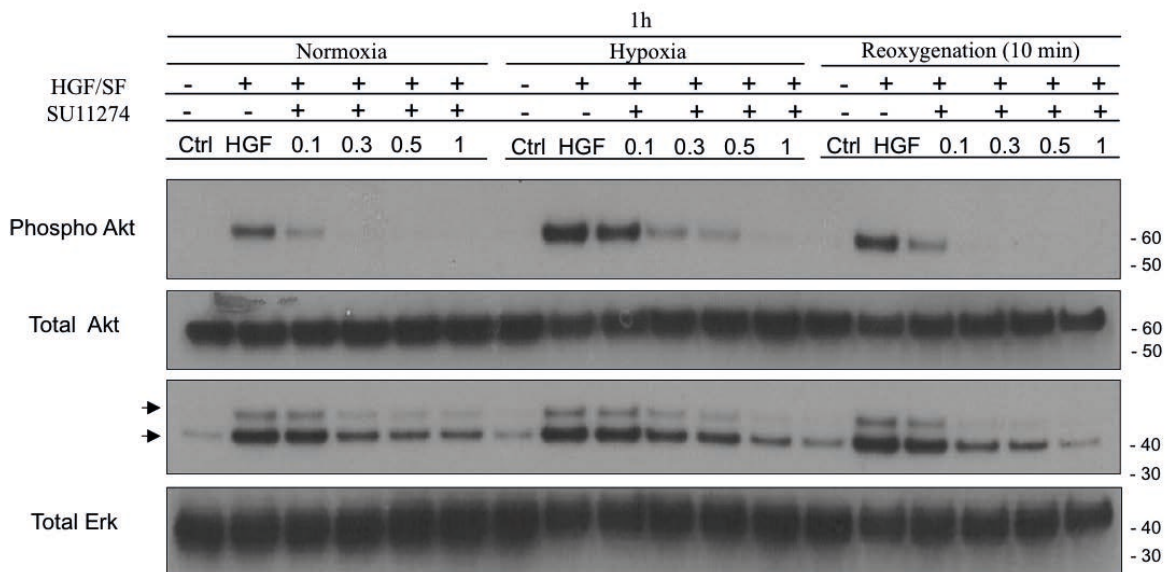
Supplementary Figure S 3



Supplementary Figure S 4



Supplementary Figure S 5



Supplementary Figure S 6

Figure legends:

Figure 1: Effect of hypoxia on MET phosphorylation and activation of the AKT and ERK downstream pathways

Hela (A), MDCK (B), and MCF10A (C, D) cells were incubated under normoxia or hypoxia for 1 or 24 h and treated or not for 10 minutes with 10 ng/mL HGF/SF. MCF10A cells (E) were placed under normoxic or hypoxic conditions for 1.5 h, then treated for 10 minutes with HGF/SF at 50, 30, 10, 3, 1, or 0.3 ng/mL. A control without HGF/SF stimulation was included. For each cell line in Figs. A, B, and C, the same amount of protein was resolved by 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies directed against the indicated phosphorylated residue(s) in the MET kinase domain (Y1234/1235), juxtamembrane domain (Y1003), or C-terminal domain (Y1349) or against one of the following: the MET kinase domain, phosphorylated AKT, AKT, phosphorylated ERK, ERK2, or the hypoxia marker HIF1a or carbonic anhydrase IX (CAIX). ERK2 was used to assess loading. The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrows indicate the positions of precursor and mature full-length MET and ERK1/2 proteins. For Figure D, the western blot was captured with a CCD camera and levels of the phosphorylated form of MET (Y1234 and 1235) were quantified. Each level is expressed as a percentage of the level measured under normoxia (n=3; \pm SD). For Figure E, increasing concentrations of HGF/SF were added to cells and incubated with AlphaScreen donor and acceptor beads. Error bars represent standard deviations (\pm SD).

Figure 2: Dynamics of the hypoxia-triggered decrease in MET phosphorylation and its reversal upon reoxygenation

(A) MCF10A cells were placed under normoxia or hypoxia for 1 h. They were then treated, under the same oxygen pressure, with 10 ng/mL HGF/SF for 1, 3, 5, 7, 10, 20, and 30 minutes. A control (Ctrl) without any HGF/SF stimulation was also performed. (B) HT1080 cells were placed under hypoxia for 15, 30, 45, or 60 minutes. They were also placed under hypoxia for 1 h and then returned to normoxia for 15, 30, 45, and 60 min (re-oxygenation). A control under normoxic (N) conditions was also included. (A, B) For each cell line, the same amount of protein was resolved by 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies directed against one of the following: phosphorylated residues in the MET kinase domain, (Y1234/1235) the MET kinase domain, ERK2, the hypoxia marker HIF1a, phosphorylated AKT, AKT, phosphorylated ERK (for MCF10A), phosphorylated GAB1 (for HT1080). ERK2 was used to assess loading. The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrows indicate the positions of precursor and mature full-length MET and ERK1/2 proteins.

Figure 3: Involvement of MET in AKT and ERK pathway activation under hypoxia

MCF10A cells were transfected with a pool of three MET-targeting siRNAs (20nM) (A), a pool of two GAB1-targeting siRNAs (B), or a control siRNA (siCtrl). A control without siRNA was also included (Ctrl). The cells were then placed for 1 h under normoxic or hypoxic conditions and treated or not for 10 min with 10 ng/mL HGF/SF. In each experiment, the same amount of protein was resolved by 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies directed against one of the following:

phosphorylated residues in the MET kinase domain (Y1234/1235), the MET kinase domain, phosphorylated AKT, AKT, phosphorylated ERK, ERK2, phosphorylated GAB1, GAB1, or hypoxia marker HIF1a. ERK2 was used to assess loading. The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrows indicate the positions of precursor and mature full-length MET and ERK1/2 proteins.

Figure 4: Effect of hypoxia mimetics on MET phosphorylation

MCF10A cells were treated with CoCl_2 (100 μM) or hydralazine (200 μM) and placed under normoxic or hypoxic (H) conditions overnight. They were then treated or not for 10 minutes with HGF/SF at 10 ng/mL. The same amount of protein was resolved by 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies directed against one of the following: phosphorylated residues in the MET kinase domain (Y1234/1235), the MET kinase domain, phosphorylated AKT, AKT, phosphorylated ERK, ERK2, or hypoxia marker HIF1a. ERK2 was used to assess loading. The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrows indicate the positions of precursor and mature full-length MET and ERK1/2 proteins.

Figure 5: Decreased MET phosphorylation in hypoxic areas of GTL16 tumor xenografts

GTL16 cells were xenografted subcutaneously into flanks of SCID mice. Tumors were analyzed by immunohistochemistry on 7- μm -thick sections with antibodies directed against the intracellular domain of MET, the phosphorylated form of MET (on the residues Y1234/1235), or the hypoxia marker CAIX. Two tumors are shown in this figure. Left panels: magnification factor x4; right panels: magnification factor x20 (applied to the boxed region).

Figure 6: Effect of the MET phosphorylation decrease observed under hypoxia on biological responses induced by HGF/SF.

(A) MDCK cells were seeded on a layer of Matrigel™ for 24 h and then stimulated or not with 10 ng/mL HGF/SF, placed under normoxia or hypoxia for an additional 24 h, and photographed. The white scale bar corresponds to 200 μm . **(B)** MDCK cells were seeded and, after adhesion, serum-starved in the presence or absence of HGF/SF at 10 ng/mL. They were then placed under normoxic or hypoxic conditions for 24 h and fixed, stained with hematoxylin and eosin, and photographed. The white scale bar corresponds to 200 μm . **(C)** MDCK cells were seeded in an IBIDI® insert. The next day, they were treated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mitomycin-c to prevent proliferation. An hour later, the mitomycin-c was removed and the cells were left overnight under normoxic or hypoxic conditions. The cells were then photographed. White scale bar: 200 μm . **(D)** MDCK cells were seeded and serum-starved for 24 h after adhesion. The cells were then treated or not with 0.7 μM anisomycin in the presence or absence of 25 ng/mL HGF/SF. The next day, they were stained with propidium iodide (PI) for evaluation of cell viability.

Figure 7: Responses to the tyrosine kinase inhibitor PHA-665752 under hypoxia and reoxygenation

(A) MCF10A cells were treated with the MET tyrosine kinase inhibitor PHA-665752 at the indicated concentrations and then placed under normoxia or hypoxia for 1 h or under hypoxia for 1 h and then

normoxia for 10 minutes (reoxygenation). The cells were then stimulated or not for 10 min with 10 ng/mL HGF/SF. The same amount of protein was resolved by 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies directed against phosphorylated residues of the MET kinase domain (Y1234/1235), the MET kinase domain, phosphorylated AKT, AKT, phosphorylated ERK, or ERK2. ERK2 was used to assess loading. The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrows indicate the positions of precursor and mature full-length MET and of ERK1/2 proteins. **(B)** MCF10A cells were placed under normoxic or hypoxic conditions for 1.5 h or hypoxia for 1.5 h and then normoxia for 10 minutes (reoxygenation) then treated for 10 minutes with HGF/SF 10 ng/mL and PHA-665752 at 10^{-3} , $3 \cdot 10^{-3}$, 10^{-2} , $3 \cdot 10^{-2}$, 0.1, 0.3 and 1 μ M. A control without HGF/SF and/or PHA-665752 was included. Error bars represent standard deviations ($n=3$; \pm SD). **(C)** MDCK cells were seeded on a layer of Matrigel™ for 24 h and then stimulated or not with 10 ng/mL HGF/SF, with or without 0.1 μ M PHA-665752. They were then placed under normoxia or hypoxia for an additional 24 h. Finally they were photographed. White scale bar: 200 μ m.

Supplementary Figure S1: Effect of hypoxia on MET phosphorylation and activation of downstream pathways

HT1080 cells (**A, F**), HepG2 cells (**B**), and keratinocytes (**C**) were placed under normoxic (N) or hypoxic (H) conditions for 1 or 24 hours and treated or not for 10 minutes with 10 ng/mL HGF/SF. MCF10A cells (**D**) and HT1080 cells (**E**) were placed under the same conditions and treated or not for 10 minutes with 10 ng/mL EGF. For each cell line, the same amount of protein was resolved by 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies directed against one of the following: phosphorylated residues in the MET kinase domain (Y1234/1235), the MET kinase domain, phosphorylated EGF receptor, EGF receptor, phospho-tyrosines, phosphorylated AKT, AKT, phosphorylated ERK, ERK2, phosphorylated-tyrosines, hypoxia marker HIF1a. ERK2 was used to assess loading. The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrows indicate the positions of precursor and mature full-length MET and ERK1/2 proteins.

Supplementary Figure S2: Involvement of MET and GAB1 in AKT and ERK pathway activation under hypoxia

MCF10A cells were transfected with each of the three MET-targeting siRNAs (**A**) or each of the two GAB1-targeting siRNAs (**B**) and placed under normoxic or hypoxic conditions for 1 h. They were then treated or not for 10 minutes with HGF/SF at 10 ng/mL. In each experiment, the same amount of protein was resolved by NuPAGE 4-12% Bis-Tris and analyzed by western blotting with antibodies against one of the following: phosphorylated residues in the MET kinase domain (Y1234/1235), the MET kinase domain, phosphorylated AKT, AKT, phosphorylated ERK, ERK2, phosphorylated GAB1, GAB1, or hypoxia marker HIF1a. ERK2 was used to assess loading. The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrows indicate the positions of precursor and mature full-length MET and ERK1/2 proteins.

Supplementary Figure S3: A general phosphatase inhibitor restores MET phosphorylation but a Shp1/2-specific phosphatase inhibitor does not.

MCF10A cells (**A, B**) were placed under normoxic or hypoxic conditions for 1 hour. They were treated or not with sodium orthovanadate (**A**) or with a Shp-1/2 inhibitor at increasing concentrations (300 nM, 1 μ M, 10 μ M) (**B**) for 10 minutes in the presence or absence of HGF/SF at 10 ng/mL. In each experiment, the same amount of protein was resolved by 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies directed against phosphorylated residues of the MET kinase domain (Y1234/1235), the MET kinase domain, phosphorylated AKT, AKT, phosphorylated ERK, ERK2, or hypoxia marker HIF1a. ERK2 was used to assess loading. The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrows indicate the positions of precursor and mature full-length MET and of ERK1/2 proteins.

Supplementary Figure S4: Hypoxia causes decreased MET and GAB1 phosphorylation in MET-overexpressing cells.

GTL16 cells (**A**), EBC-1 cells (**B**), and HS746T cells (**C**) were placed under normoxic (N) or hypoxic (H) conditions for 1 or 24 h and treated or not for 10 min with 10 ng/mL HGF/SF. For each cell line, the same amount of protein was resolved by 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE and analyzed by western blotting with

antibodies directed against phosphorylated residues of the MET kinase domain (Y1234/1235), the MET kinase domain, the hypoxia marker HIF1a or carbonic anhydrase IX, phosphorylated GAB1 (for GTL16 and EBC1), or phosphorylated AKT, AKT, or phosphorylated ERK (for HS746T), ERK2 was used to assess loading. The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrows indicate the positions of precursor and mature full-length MET and ERK1/2 proteins.

Supplementary Figure S5: Hypoxia causes decreased MET internalization

MCF10A cells were incubated with MET agonist monoclonal antibody and placed under normoxic or hypoxic conditions for 1 and 2 hours. Immunofluorescence was performed with FITC-conjugated anti-mouse IgG to follow MET antibody internalization. White scale bar corresponds to 20 μm .

Supplementary Figure S6: Responses to the tyrosine kinase inhibitor SU11274 under hypoxia and reoxygenation

MCF10A cells were treated with the MET tyrosine kinase inhibitor SU11274 at the indicated concentrations and then placed under normoxia or hypoxia for 1 h or under hypoxia for 1 h and then reoxygenated for 10 minutes. The cells were then stimulated or not for 10 min with 10 ng/mL HGF/SF. In all experiments the same amount of protein was resolved by 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies directed against phosphorylated AKT, AKT, phosphorylated ERK, or ERK2. ERK2 was used to assess loading. The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrows indicate the positions of ERK1/2 proteins.

II.3. Expériences complémentaires :

Dans ce chapitre, je décris en détail les expériences qui n'ont pas été incluses dans l'article et qui concernent, pour la plupart, la recherche du mécanisme susceptible d'expliquer la diminution de phosphorylation de MET en hypoxie. Dans ces différentes expériences, nous avons, d'une part, recherché les raisons de la baisse de phosphorylation de MET en hypoxie en utilisant d'autres agonistes de MET mais également en analysant l'effet de l'hypoxie sur des lignées surexprimant le récepteur. Par ailleurs, nous avons analysé l'effet d'une hypoxie « instantanée ». D'autre part, vu le rôle établi de certaines phosphatases dans la régulation du récepteur, nous nous sommes intéressés à leur rôle dans la baisse de phosphorylation de MET en hypoxie.

De plus, nous nous sommes intéressés au rôle de la Sérine 985 du domaine juxtamembranaire du récepteur MET. En effet, quand cette sérine est phosphorylée par les PKC δ et ϵ , elle induit la régulation négative du récepteur et induit l'inhibition de son activité tyrosine kinase.

Par ailleurs, l'effet sur la résistance aux TKI a également été évaluée avec le crizotinib, un autre ATP-mimétique ciblant MET et utilisé en clinique.

Enfin, nous avons essayé de déterminer si la baisse de phosphorylation du récepteur MET était restreinte à ce récepteur ou s'il s'agissait d'un phénomène commun à d'autres RTK. Nous avons donc analysé spécifiquement l'effet de l'hypoxie sur la signalisation EGF/EGFR ainsi que son effet sur la résistance au géfinitib, un TKI ciblant l'EGFR et utilisé en clinique.

II.3.1 Effets de l'hypoxie sur la signalisation HGF/SF-MET :

II.3.1.1. Effets d'une stimulation par du surnageant de MRC5 et par du K1/S :

Dans le but d'exclure un défaut d'accessibilité de l'HGF/SF recombinant commercial vis-à-vis de MET nous avons utilisé deux autres méthodes pour activer MET. Ainsi, nous avons tout d'abord utilisé du surnageant de fibroblastes (MRC5). En effet, les fibroblastes produisent naturellement du pro-HGF/SF. Nous avons également utilisé un agoniste de MET chimiquement synthétisé dans le laboratoire par notre équipe. Cet

agoniste comprend la région Kringle 1 de l'HGF/SF couplée à la streptavidine (K1/S) permettant de former un dimère actif. Les résultats sont illustrés dans la figure 29.

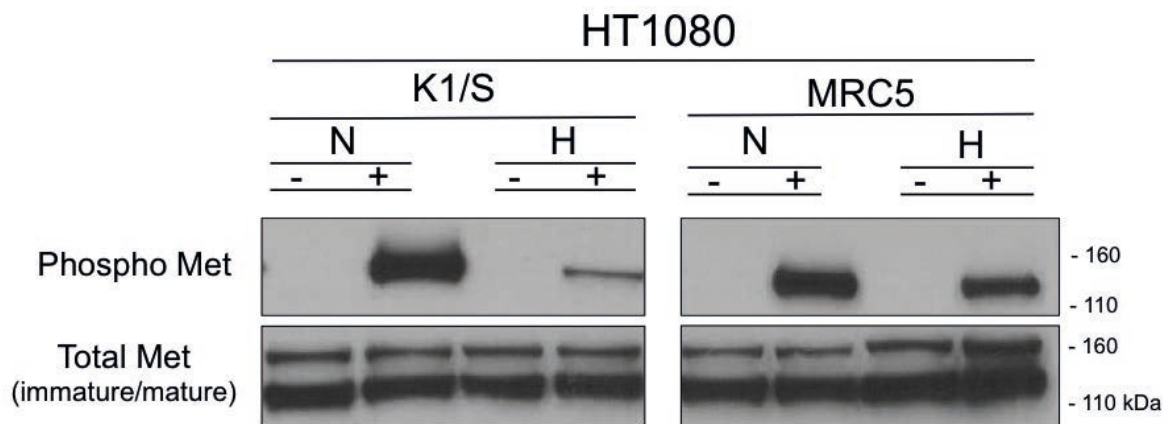


Figure 29 - Effets d'une stimulation des HT1080 par du K1/S (gauche) ou du surnageant de MRC5 (droite) en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées

Les cellules HT1080 ont été placées en station d'hypoxie puis stimulées ou pas avec K1/S à 100 nM ou du surnageant de MRC5 pendant 10min. Les expressions de MET et Phospho-MET ont été analysées par Western Blot.

Nous remarquons que le traitement avec le K1/S et le surnageant de MRC5 induisent bien une phosphorylation de MET en normoxie. En revanche, cette phosphorylation est moins importante en hypoxie. Ces résultats confirment donc ceux obtenus avec l'utilisation de l'HGF/SF recombinant.

Nous pouvons de ce fait conclure que la phosphorylation du récepteur MET est réduite en conditions hypoxiques, et ce quel que soit l'agoniste utilisé. Ce résultat suggère donc qu'il n'y pas par exemple de défaut dans la maturation de l'HGF/SF recombinant utilisé ou un défaut d'accessibilité de l'HGF/SF vis-à-vis de son récepteur.

II.3.1.2. Effets de l'hypoxie sur des lignées GTL16 surexprimant le récepteur MET :

Par ailleurs, et afin d'exclure un défaut de liaison de l'HGF/SF sur MET, nous avons utilisé différentes lignées cellulaires surexprimant MET et dont la phosphorylation est indépendante du ligand. En effet, les GTL16 et les EBC-1 possèdent une amplification génique de *met* menant à sa surexpression et à sa phosphorylation constitutive. La lignée HS746T contient quant à elle une délétion de l'exon 14 menant à

un défaut d'internalisation et de dégradation de MET, et donc, à sa surexpression. Nous avons observé une baisse de phosphorylation du récepteur en hypoxie dans ces trois lignées (supplementary figure S4 de l'article). Par la suite et à l'aide de la technologie AlphaScreen® nous avons quantifié la phosphorylation du récepteur MET dans les cellules GTL16 en normoxie et en hypoxie. La technologie AlphaScreen® (ALPHA pour *Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay*) est une méthode basée sur un transfert d'énergie entre deux billes fonctionnalisées : une bille « donneur » (donor bead) couplée à la protéine A et qui émet un singulet d'oxygène et une bille « accepteur » (acceptor bead) couplée à la streptavidine et qui convertit le singulet en photons quand elle est à proximité de la bille donneur (< 200 nm) suite à une interaction biologique. Cette interaction se fait suite à l'utilisation de deux anticorps, l'un reconnaissant spécifiquement la forme totale de la protéine d'intérêt (ici MET) et l'autre reconnaissant spécifiquement sa forme phosphorylée (ici Phospho-MET). Il s'agit, en l'espèce, d'un équivalent d'ELISA sandwich en phase homogène (c-à-d sans lavage intermédiaire). Les résultats sont illustrés dans la figure 30.

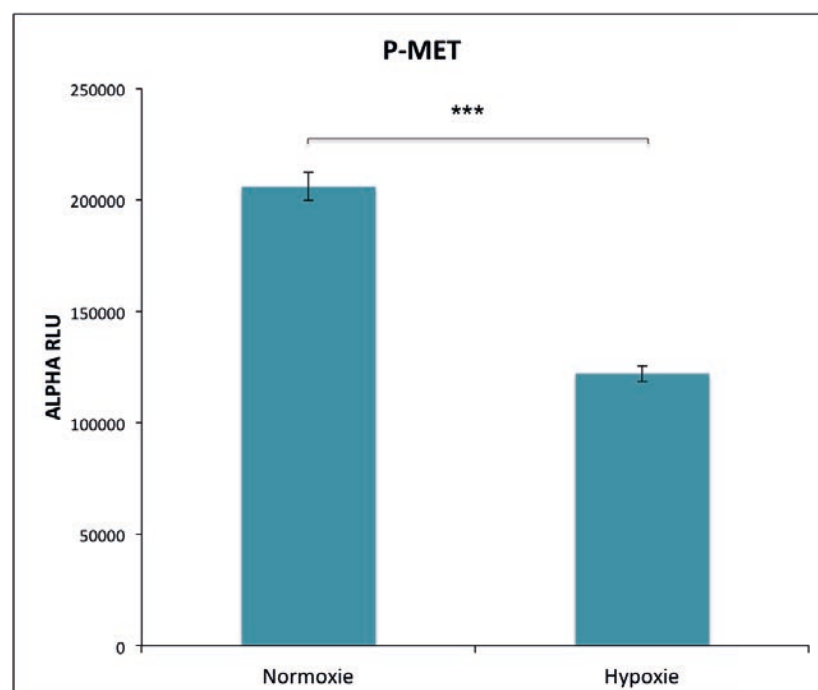


Figure 30 – Quantification de la phosphorylation du récepteur MET en conditions normoxiques et hypoxiques contrôlées.

Les cellules GTL16 ont été incubées en conditions normoxiques et hypoxiques pendant 1.5 h. La phosphorylation de MET a été quantifiée par la technologie AlphaScreen® (n=3, ±SD).

Nous remarquons qu'il y a une baisse d'environ 59% de la phosphorylation de MET en hypoxie dans les cellules GTL16. Ces résultats confirment ceux obtenus en *western blot* et suggèrent que la baisse de phosphorylation de MET en hypoxie n'est pas liée à un défaut de liaison du ligand sur son récepteur.

Pris dans leur ensemble, les résultats concernant l'utilisation de différents agonistes et ceux concernant l'utilisation de lignées cellulaires présentant une activation constitutive de MET, démontrent que la baisse de phosphorylation de MET en hypoxie n'est liée ni à un défaut de maturation de l'HGF/SF ou d'accessibilité de celui-ci vis-à-vis de MET, ni à un défaut de liaison de l'HGF/SF sur MET.

II.3.1.3. Effets immédiats de l'hypoxie : « choc hypoxique »

Nous avons cherché à déterminer si l'effet de l'hypoxie sur la phosphorylation du récepteur MET nécessitait un temps minimal, lié ou pas à la stabilisation de HIF1a par exemple, ou s'il s'agissait d'un effet rapide. Nous avons déjà incubé nos cellules en hypoxie à des temps allant de 15 min à 1h. En parallèle, nous avons placé nos cellules en hypoxie pendant 1h puis réoxygénées à des temps allant de 15 min à 1h. Nous avons observé une baisse drastique de la phosphorylation de MET dès 15 min d'hypoxie. Ce phénomène est rapidement réversible, puisque dès 15min de réoxygénation, la phosphorylation du récepteur est restaurée (figure 2B du manuscrit). Par la suite, nous avons cherché à réduire encore le temps d'hypoxie afin de savoir si la réduction de la phosphorylation était immédiate en hypoxie comme nos résultats précédents le suggéraient. J'ai nommé cette incubation très courte en hypoxie « choc hypoxique ».

Nous avons donc introduit des MCF10A et des HT1080 dans la station hypoxie et les avons immédiatement stimulés avec de l'HGF/SF pendant 10min. Les résultats sont illustrés dans la figure 31. L'incubation en hypoxie n'a donc pas dépassé 10min.

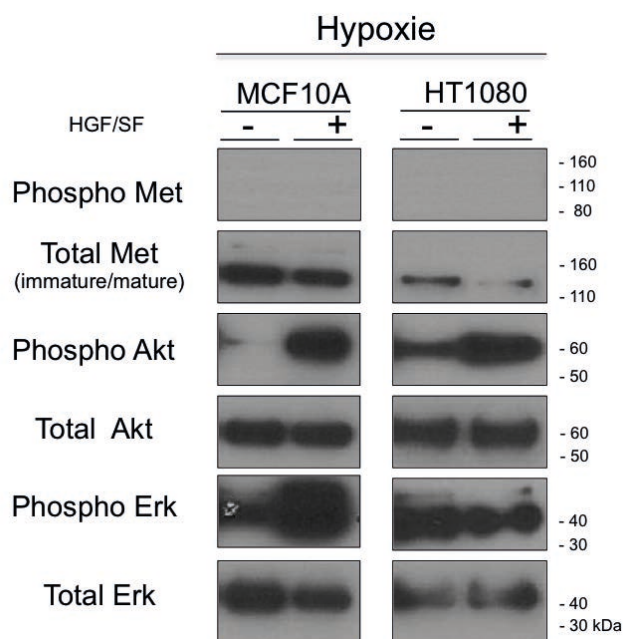


Figure 31 - Effet d'un « choc hypoxique » sur la signalisation HGF/SF-MET.

Les cellules MCF10A et HT1080 ont été placées en station d'hypoxie puis immédiatement stimulées ou pas avec de l'HGF/SF à 10ng/mL pendant 10min. Les expressions de MET, Phospho-MET, Akt, Phospho-Akt, Erk, Phospho-Erk ont été analysées par Western Blot.

Dans cette expérience, nous obtenons une diminution importante de la phosphorylation de MET alors que l'activation des voies de signalisation en aval est maintenue, suggérant que le mécanisme menant à ces effets est très rapide.

II.3.1.4. L'activation des voies de signalisation en aval est bien due à l'activation du récepteur MET :

Ce point a déjà été abordé dans l'article avec l'utilisation de siRNA ciblant MET. En effet, ces siRNA ciblant spécifiquement MET ont inhibé de manière efficace l'activation de AKT et ERK suite à une stimulation par de l'HGF/SF (figure 3A de l'article). Néanmoins, d'autres expériences avec des inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant MET (PHA-665752 et SU11274) ont été réalisées afin de confirmer ces résultats.

Nous avons montré dans l'article l'existence d'une résistance à ces deux TKI en hypoxie. Ces expériences ont été réalisées avec des doses croissantes d'inhibiteurs. Néanmoins, des expériences préalables ont été effectuées avec de fortes doses (0.3 μ M pour le PHA-665752 et 1 μ M pour le SU11274 à 1 μ M) pour s'assurer d'une inhibition

complète de l'activation du récepteur en hypoxie. Les résultats sont illustrés dans la figure 32.

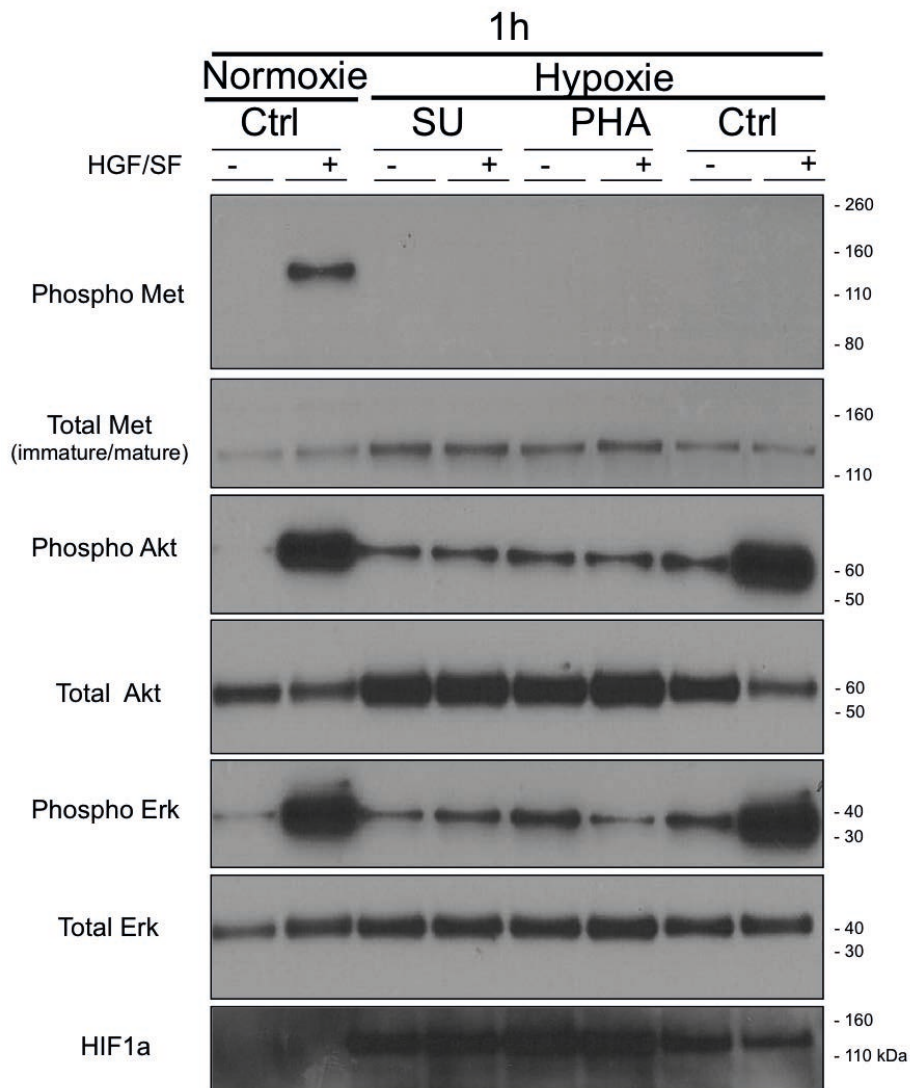


Figure 32 - Effets d'un traitement par du PHA-665752 et du SU11274 en présence ou non d'HGF/SF en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées.

Les cellules MCF10A ont été traitées ou pas avec du PHA-665752 à 0.3 μ M et SU11274 à 1 μ M et cultivées en conditions hypoxiques pendant 1h. Elles sont ensuite stimulées ou pas avec de l'HGF/SF à 10ng/mL pendant 10min. Les expressions de MET, Phospho-MET, Akt, Phospho-Akt, Erk, Phospho-Erk et HIF1a ont été analysées par Western Blot.

Nous remarquons qu'en conditions contrôles, MET est phosphorylé en normoxie alors que cette phosphorylation n'est pas détectable en hypoxie. Par ailleurs, les traitements par les deux TKI à des concentrations élevées a conduit à l'inhibition de l'activation des voies AKT et ERK en conditions hypoxiques, confirmant que l'activation de ces deux voies de signalisation est bien dépendante de l'activité kinase de MET.

II.3.2. Recherche du mécanisme menant à la baisse de phosphorylation de MET en hypoxie :

II.3.2.1. Rôle de la sérine985 :

Par la suite nous nous sommes intéressés aux mécanismes menant à une régulation négative du récepteur. Nous nous sommes donc penchés sur le rôle de la sérine 985 du domaine juxtamembranaire de MET. En effet, il a été montré que cette sérine régule négativement l'activité du récepteur lorsqu'elle est phosphorylée. Sa phosphorylation est induite par les PKC δ et ϵ et sa déphosphorylation par la phosphatase PP2A.

Nous avons donc cherché à élucider l'implication de sérine 985 dans la baisse de phosphorylation de MET en hypoxie. Notre hypothèse était qu'en conditions hypoxiques, une phosphorylation de la sérine 985 par les PKC puisse réduire l'activité tyrosine kinase de MET. Ainsi, nous avons cherché à déterminer si l'inhibition des PKC permettait de restaurer une phosphorylation du récepteur en hypoxie. Nous avons de ce fait utilisé des concentrations croissantes de BIM I (BisIndolylMaleimide I), un inhibiteur pharmacologique des PKC (inhibiteur des PKC α , β , γ , δ et ϵ), et analysé l'effet de cette inhibition sur la phosphorylation de MET sur les tyrosines Y1234 et Y1235. De plus, en utilisant un anticorps reconnaissant la séquence de phosphorylation spécifique des PKC (les PKC phosphorylent des sérines ou des thréonines avec une arginine ou une lysine en position -3, -2 et +2 et un acide aminé hydrophobe à la position +1), nous avons évalué la phosphorylation de l'ensemble des résidus sérines susceptibles d'être phosphorylés par les PKC.

A noter que les PKC δ et ϵ impliquées dans la phosphorylation de la sérine 985 de MET reconnaissent un site consensus composé de : « arginine en position -3, lysine en -2 et phénylalanine en +1 » pour la PKC δ et « arginine en position -3, arginine, lysine ou glutamine en -2 et valine en +1 » pour la PKC ϵ .

Les résultats sont illustrés au niveau de la figure 33.

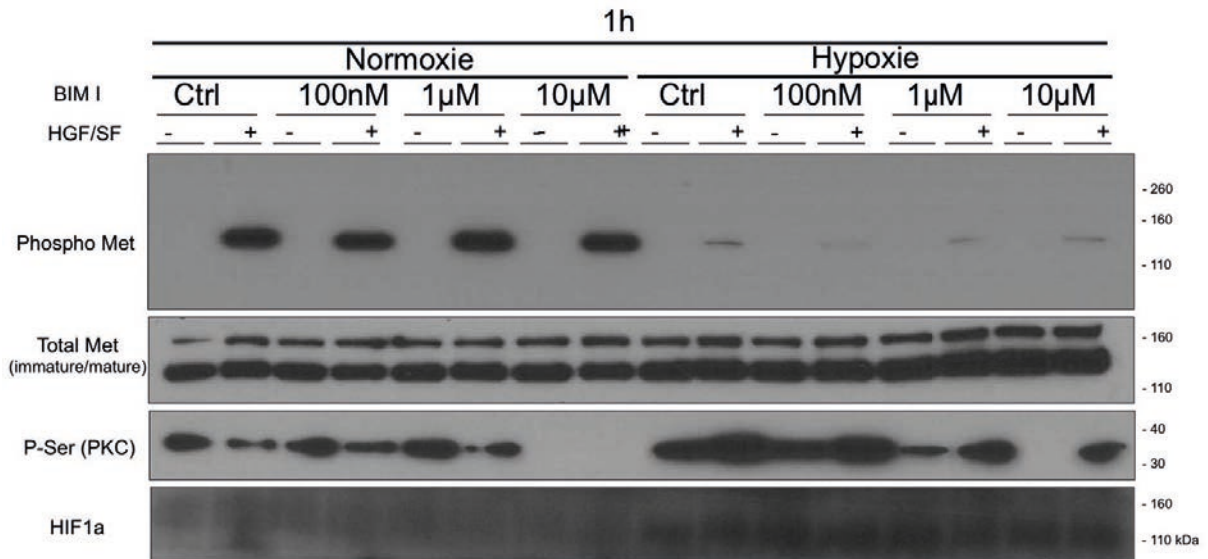


Figure 33 – Effets d’un traitement par un inhibiteur de PKC à doses croissantes en présence ou pas d’HGF/SF en conditions de normoxie et d’hypoxie contrôlées.

Les MCF10A ont été incubées en normoxie et en hypoxie pendant 1h puis stimulées ou pas avec des concentrations croissantes de BIM I (100nM, 1µM et 10 µM) en présence ou pas d’HGF/SF à 10ng/mL pendant 10min. Les expressions de MET, Phospho-MET, Phospho-Sérines et HIF1a ont été analysées par Western Blot.

Dans les cellules MCF10A l’anticorps anti-phospho-sérine reconnaît une bande majoritaire que nous n’avons pas identifiée. Nous pouvons remarquer que la phosphorylation de la sérine de cette protéine est augmentée en hypoxie. A partir de 1 µM de BIM I, cette phosphorylation est inhibée ce qui suggère une efficacité de ce composé à inhiber l’action des PKC. En normoxie, la phosphorylation de la sérine de cette protéine est moins importante et ne semble pas être inhibée par BIM I. Par ailleurs, nous remarquons que la stimulation par de l’HGF/SF diminue la phosphorylation de la sérine en normoxie alors qu’elle l’augmente en hypoxie, sans que l’on ait réussi à l’expliquer. Néanmoins, malgré l’augmentation de la phosphorylation des sérines en hypoxie, la phosphorylation de MET n’est pas restaurée suggérant que la sérine 986 n’est pas impliquée dans la régulation négative du récepteur observée dans nos expériences. Ces résultats ont par ailleurs également été obtenus en utilisant le G06983, un autre inhibiteur spécifique des PKC.

Afin d’exclure l’implication de la sérine 985 dans la baisse de phosphorylation de MET en hypoxie, nous avons utilisé la lignée HS746T issue de cancer gastrique exprimant une forme de MET portant une délétion de l’exon 14. L’exon 14 du gène *met*

code une partie du domaine juxtamembranaire du récepteur contenant la sérine 985. Nous avons cultivé ces cellules en conditions normoxiques et hypoxiques et stimulées ou pas par de l'HGF/SF. Notre hypothèse était que si la sérine 985 était impliquée dans la baisse de phosphorylation de MET en conditions hypoxiques, nous n'observerions pas de différence dans la phosphorylation du récepteur en conditions normoxiques et hypoxiques. Les résultats de cette expérience sont illustrés au niveau de la figure 34.

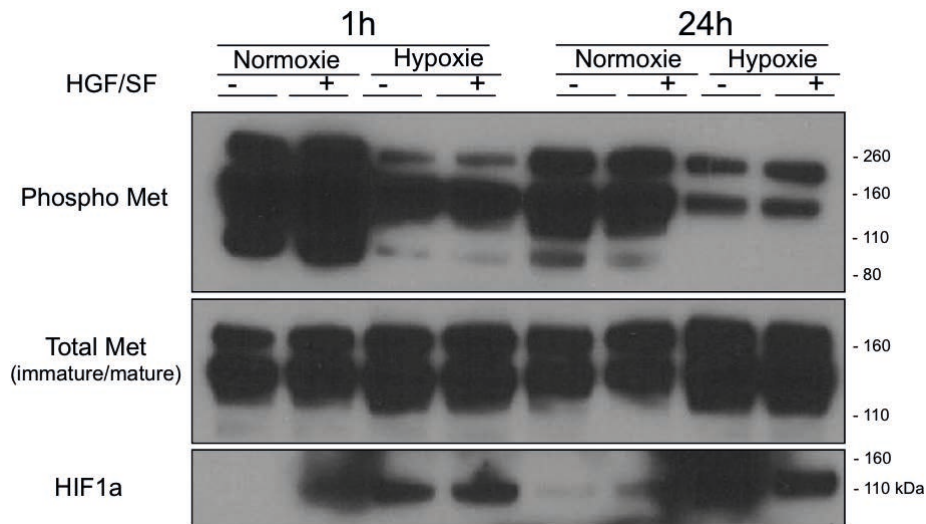


Figure 34 – Signalisation HGF/SF-MET en présence ou pas d'HGF/SF dans les HS746T en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées.

Les HS746T ont été incubées en normoxie et en hypoxie pendant 1h et 24h puis stimulées ou pas avec de l'HGF/SF à 10ng/mL pendant 10min. Les expressions de MET, Phospho-MET et HIF1a ont été analysées par Western Blot.

Nous pouvons remarquer que dans les HS746T MET est phosphorylé en basal, sans stimulation par de l'HGF/SF. Son activation est donc indépendante du ligand, ce qui est cohérent avec la délétion de l'exon 14. Par ailleurs, cette phosphorylation diminue en hypoxie de la même façon que tous les autres types cellulaires utilisés, excluant ainsi toute implication de la sérine 985 dans la baisse de phosphorylation du récepteur en hypoxie.

II.3.2.2. Rôle des phosphatases :

Compte tenu de la rapidité et la réversibilité de la baisse de phosphorylation du récepteur MET et de GAB1 en hypoxie, nous avons fait l'hypothèse que des phosphatases

puissent être impliquées dans l'établissement de ce phénomène. Nous avons donc utilisé un inhibiteur général des tyrosines phosphatases (orthovanadate de sodium) sur des MCF10A, ce qui a permis de restaurer la phosphorylation de MET en hypoxie (données supplémentaires de l'article, figure supplémentaire S3).

Par la suite, nous avons cherché à déterminer la ou les phosphatases incriminées. Nous avons commencé par tester la phosphatase Shp-2 comme décrit dans l'article (figure supplémentaire S3). Nous avons remarqué une phosphorylation de MET en normoxie qui augmente avec l'utilisation de doses croissantes d'inhibiteur de Shp-2. En revanche, l'utilisation de cet inhibiteur a échoué à restaurer la phosphorylation de MET en hypoxie. Nous nous sommes également intéressés à la phosphatase PTP1B connue pour réguler la balance phosphorylation/déphosphorylation du récepteur MET. Nous avons inhibé l'activité de la PTP1B dans les MCF10A avec le sulfanamido-benzbromarone, un inhibiteur pharmacologique sélectif et réversible. Les résultats sont illustrés dans la figure 35.

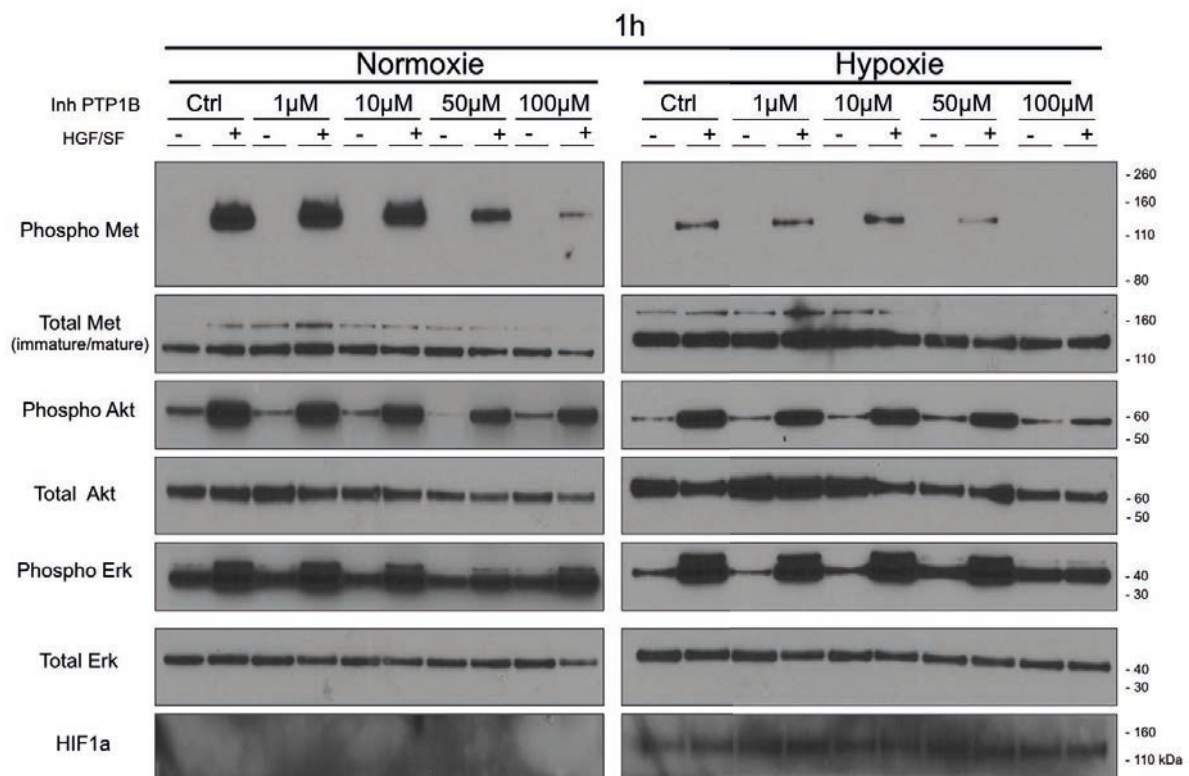


Figure 35 - Effets d'un traitement par un inhibiteur de PTP1B à doses croissantes en présence ou pas d'HGF/SF en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées.

Les MCF10A ont été incubées en normoxie et en hypoxie pendant 1h puis stimulées ou pas avec des concentrations croissantes d'un inhibiteur de PTP1B (1, 10, 50 et 100 µM) en présence ou pas d'HGF/SF à

10ng/mL pendant 10min. Les expressions de MET, Phospho-MET, Akt, Phospho-Akt, Erk, Phospho-Erk et HIF1a ont été analysées par Western Blot.

Des doses croissantes d'inhibiteur de PTP1B n'ont pas pu restaurer la phosphorylation de MET en hypoxie. Nous observons également une baisse de la phosphorylation de MET en normoxie à partir de 50 μ M de l'inhibiteur probablement due à une toxicité de ce composé à cette concentration. Donc, malgré l'utilisation fructueuse mais indicative de l'orthovanadate de sodium où on a pu restaurer la phosphorylation de MET en hypoxie, des inhibiteurs de phosphatases plus spécifiques ont échoué à faire restaurer la forme active du récepteur suggérant que ni Shp-2 ni la PTP1B ne sont impliquées dans la baisse de phosphorylation de MET en hypoxie.

II.3.2.3. Mesure de l'activité des tyrosines phosphatases :

Comme indiqué précédemment, l'étude de l'implication des phosphatases PTP1B et Shp-2 n'a pas donné de résultats pouvant les incriminer dans la baisse de phosphorylation du récepteur en hypoxie. Néanmoins, nous avons voulu déterminer si l'activité globale des tyrosines phosphatases était modifiée en hypoxie. Nous avons voulu la mesurer avec l'utilisation du *Tyrosine Phosphatase Assay System*[®] (Promega[®]). Cette mesure a été effectuée à partir de lysats de cellules cultivées en normoxie et hypoxie pendant 1 heure. Par la suite, le phosphate inorganique présent naturellement dans les cellules est éliminé puis le lysat est mis en présence d'un peptide phosphorylé. L'ajout d'une solution contenant du molybdate et du green malachite permet de quantifier le phosphate inorganique issu de la réaction de déphosphorylation des peptides. Le phosphate inorganique libéré se lie avec le molybdate et le green malachite formant ainsi un complexe qui émet à 630 nm. L'activité phosphatase correspond donc à la capacité des phosphatases présentes dans le lysat de déphosphoryler le peptide.

Cette analyse a montré qu'il y a peu ou pas de différence dans l'activité globale des phosphatases en normoxie et en hypoxie. Ceci est à mettre en parallèle avec notre expérience utilisant un anticorps anti-phospho tyrosines totales (figure supplémentaire S1 F). En effet, dans cette expérience nous remarquons que le profil global des protéines phosphorylées est similaire en normoxie et en hypoxie mis à part une bande vers 150 kDa présente en normoxie suite à une stimulation de l'HGF/SF et absente en hypoxie et qui correspondrait *a priori* à la forme phosphorylée de MET. Il semblerait donc que la

différence entre la normoxie et l'hypoxie ne concernerait qu'une ou un nombre peu élevé de phosphatases. De ce fait, étant donné la quantité de phosphatases présentes dans le lysat cellulaire, une plus forte activité de l'une (ou plusieurs) d'entre elles en conditions hypoxiques aurait difficilement pu être détectée avec cette méthode d'analyse globale.

II.3.3. Effets de l'hypoxie sur l'efficacité des thérapies ciblées :

Nous avons montré qu'en hypoxie il existe une résistance des MCF10A au PHA-665752 et au SU11274 pour l'activation des voies ERK et AKT (article figure 7 et figure supplémentaire S6). De même, alors qu'en normoxie la morphogénèse est efficacement inhibée en présence de 0.1 μ M de PHA-665752, la même concentration n'inhibe que partiellement cette réponse en hypoxie. Par ailleurs, cette résistance a été quantifiée par la technologie AlphaScreen®. Ainsi nous avons pu montrer que l'IC50 du PHA-665752 est 2.1 fois plus importante en hypoxie qu'en normoxie pour l'inhibition de l'activité de AKT et 2.4 fois plus élevée pour celle de ERK.

Nous avons également utilisé le crizotinib, un autre TKI ciblant MET, ALK et ROS1 (ATP-mimétique). Cet inhibiteur a un intérêt particulier puisqu'il est utilisé actuellement en clinique dans le traitement des cancers pulmonaires non à petites cellules (NSCLC) avec un réarrangement ALK. Les résultats sont illustrés dans la figure 36.

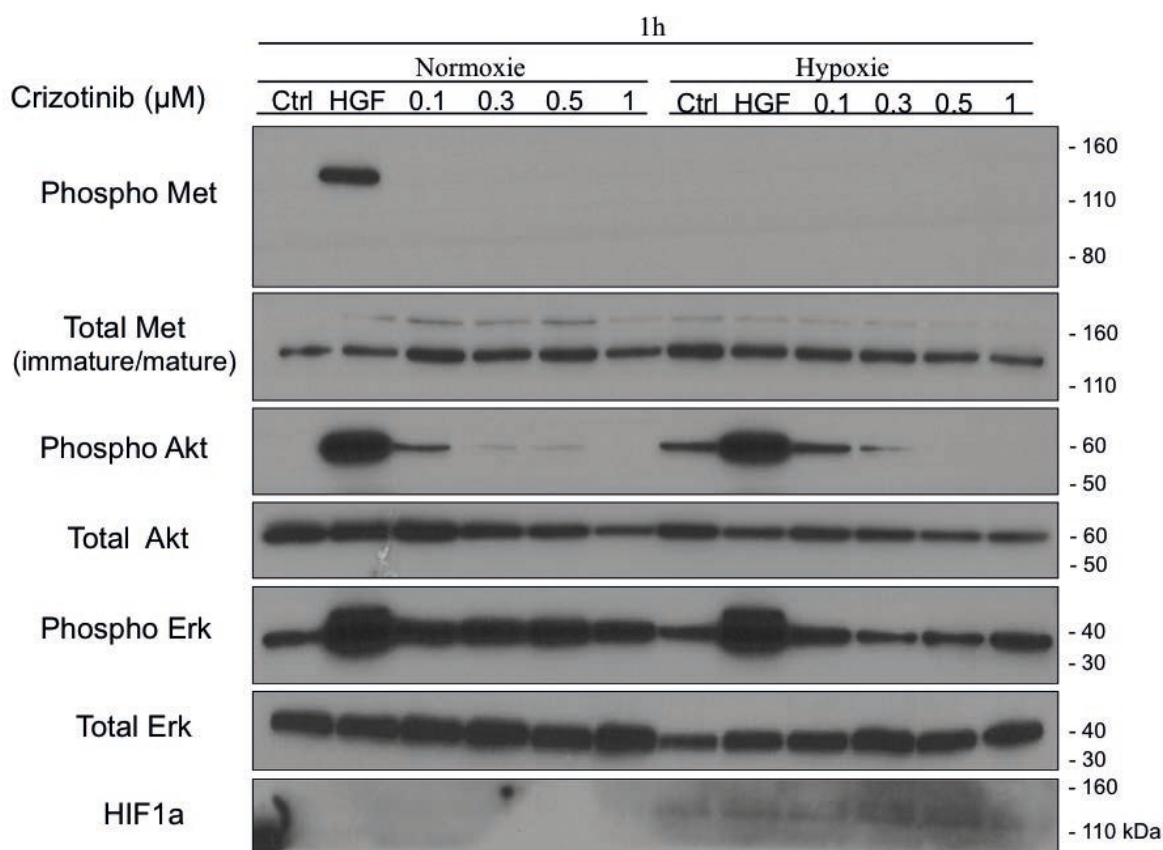


Figure 36 - Effets d'un traitement par du crizotinib à doses croissantes en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées en présence ou non d'HGF/SF.

Les MCF10A ont été traitées ou pas avec des concentrations croissantes de crizotinib (0.1, 0.3, 0.5 et $1\mu\text{M}$). Elle ont ensuite été incubées en normoxie et en hypoxie pendant 1h puis stimulées ou pas par de l'HGF/SF à 10ng/mL pendant 10min. Les expressions de MET, Phospho-MET, Akt, Phospho-Akt, Erk, Phospho-Erk et HIF1a ont été analysées par Western Blot.

Le crizotinib inhibe efficacement la phosphorylation du récepteur MET et ce dès $0.1\mu\text{M}$. Néanmoins, il n'existe pas de résistance marquée à cet inhibiteur en hypoxie. En effet, les voies de signalisation AKT et ERK semblent être fortement inhibées dès la concentration de $0.3\mu\text{M}$, autant en normoxie qu'en hypoxie.

Ce résultat est intéressant car bien que le crizotinib soit un TKI comme le PHA-665752 et le SU11274 (inhibiteurs ATP-compétitifs), cet inhibiteur est une molécule chimiquement très différente des deux autres qui ont une structure très proche avec un même cœur indolin-2-one (voir discussion, figure 39). Cette différence pourrait éventuellement expliquer la divergence des résultats obtenus pour ces trois TKI.

II.3.4. Effets de l'hypoxie sur la signalisation EGF/EGFR :

Afin de déterminer si la baisse de phosphorylation du récepteur est restreinte à MET ou concerne d'autres récepteurs, nous avons analysé l'effet de l'hypoxie sur la signalisation EGF/EGFR. A cet effet, nous avons placé des MCF10A en conditions normoxiques et hypoxiques pendant 1h. Les cellules sont ensuite stimulées ou pas par de l'HGF/SF ou de l'EGF à 10ng/mL. Les résultats sont illustrés au niveau de la figure 37.

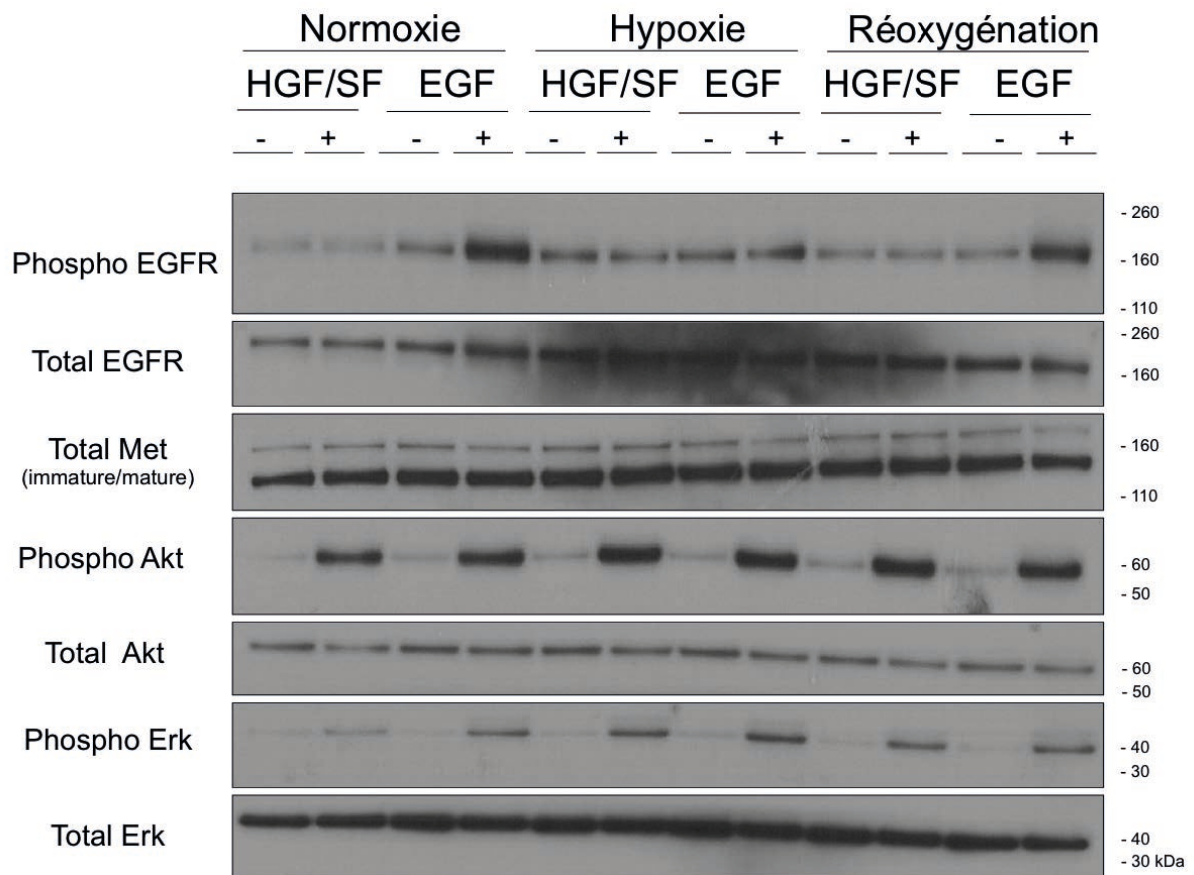


Figure 37 - Signalisation EGF/EGFR en présence ou pas d'HGF/SF ou d'EGF dans les MCF10A en conditions de normoxie, d'hypoxie et de réoxygénation contrôlées.

Les MCF10A ont été incubées en normoxie et en hypoxie pendant 1h et en hypoxie pendant 1h puis réoxygénées pendant 10min. Elles sont par la suite stimulées ou pas avec de l'HGF/SF ou de l'EGF à 10ng/mL pendant 10min. Les expressions de EGFR, Phospho-EGFR, MET, Akt, Phospho-Akt, Erk et Phospho-Erk ont été analysées par Western Blot.

Comme attendu, la stimulation par de l'HGF/SF n'induit pas de phosphorylation de l'EGFR. En revanche, une stimulation par de l'EGF induit bien une activation de l'EGFR en normoxie, évaluée par la détection de sa forme phosphorylée. Néanmoins,

cette phosphorylation est plus faible en hypoxie. Comme pour MET, cette baisse de phosphorylation est réversible en réoxygénant les cellules et n'affecte pas l'activation des voies de signalisation en aval AKT et ERK. Ces résultats suggèrent que le mécanisme menant à nos observations ne concernerait pas *a priori* que le récepteur MET mais concernerait également l'EGFR. La baisse de phosphorylation de l'EGFR est néanmoins beaucoup moins importante que celle de MET.

De ce fait, comme pour MET, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'une résistance aux TKI ciblant ce RTK en hypoxie. Cette démarche est d'autant plus pertinente que c'est en analysant l'efficacité du géfitinib dans l'inhibition de l'EGFR qu'une étude a démontré une efficacité plus grande de ce TKI quand le récepteur était en conformation active suite à une mutation (Yun et al 2007).

Nous avons donc traité des MCF10A avec des doses croissantes de géfitinib, en conditions normoxiques et hypoxiques pendant 1h et en conditions hypoxiques pendant 1h puis en conditions normoxiques pendant 10min (réoxygénation) en présence ou non d'EGF à 10ng/mL. Les résultats sont illustrés dans la figure 38.

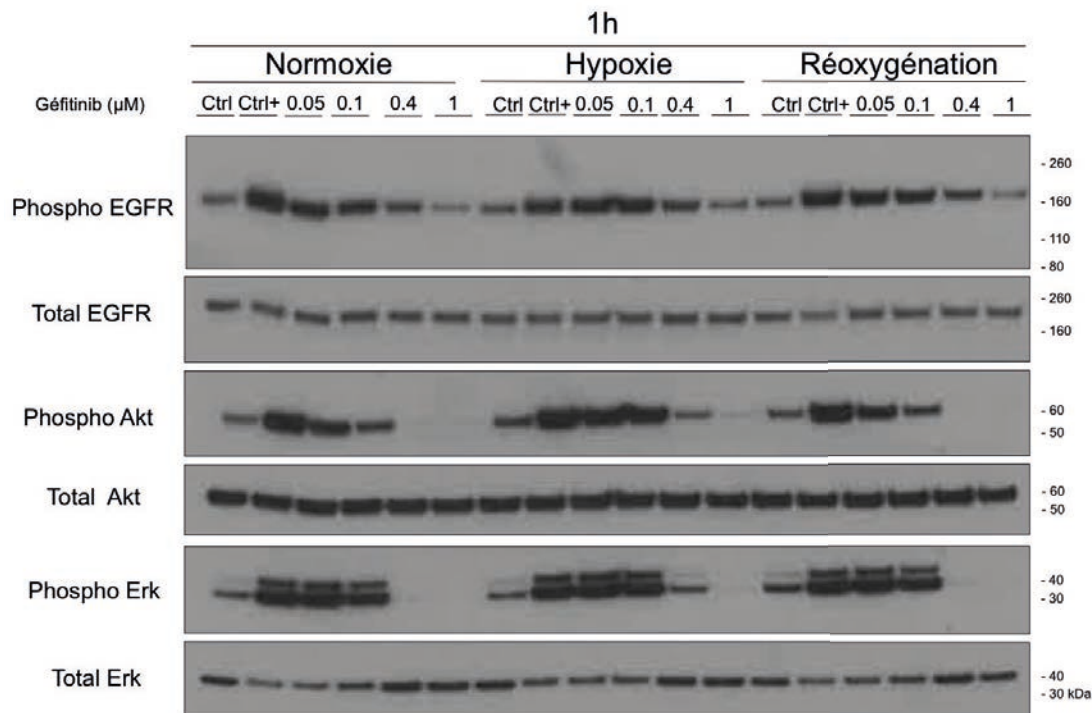


Figure 38 - Effets d'un traitement par du géfitinib à doses croissantes en conditions de normoxie, d'hypoxie et de réoxygénation contrôlées en présence ou non d'EGF.

Les MCF10A sont stimulées ou pas avec des concentrations croissantes de géfitinib (0.05, 0.1, 0.4 et 1 μM) et sont incubées en normoxie et en hypoxie pendant 1h et en hypoxie pendant 1h puis réoxygénées pendant 10min. Les cellules sont ensuite stimulées ou pas par de l'EGF à 10ng/mL pendant 10min. Les expressions de EGFR, Phospho-EGFR, Akt, Phospho-Akt, Erk et Phospho-Erk ont été analysées par Western Blot.

Nous remarquons que le géfitinib inhibe la phosphorylation de l'EGFR de façon dose dépendante sans qu'il n'y ait de différences significatives en normoxie et en hypoxie. Néanmoins, en conditions hypoxiques, il faut une concentration plus élevée de géfitinib ($> 1 \mu\text{M}$) pour atteindre une inhibition des voies AKT et ERK équivalente à celle obtenue en normoxie. De manière intéressante, une réoxygénation de 10min des cellules est suffisante pour restaurer l'efficacité de l'inhibiteur.

Discussion

Le récepteur tyrosine kinase MET et son ligand l'HGF/SF jouent un rôle central dans le développement embryonnaire et la régénération tissulaire. Ils régulent plusieurs voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la survie, la motilité et l'invasion cellulaires ainsi que l'angiogenèse. La dérégulation de cette signalisation par différentes altérations moléculaires peut contribuer au développement tumoral. En effet, une amplification génique de *met*, des mutations génétiques et notamment la délétion de l'exon 14 ainsi qu'une activation aberrante du récepteur par l'HGF/SF ont été observées dans les cancers humains (poumons, reins, seins) et sont souvent corrélées avec un mauvais pronostic (Boccaccio and Comoglio 2006, Humphrey et al 2006).

La signalisation HGF/SF-MET est particulièrement complexe puisqu'elle implique de nombreux partenaires (co-facteurs, co-récepteurs, enzymes de maturation..) au niveau extracellulaire. Le microenvironnement y joue également un rôle important, cependant son impact direct sur la signalisation de MET reste à élucider.

Au cours de ma thèse, nous avons tenté de mettre en évidence le rôle direct du micro-environnement tumoral dans la modulation de la signalisation HGF/SF-MET. Au cours de la première partie, nous avons voulu plus particulièrement évaluer le rôle de l'héparanase et de l'acidification extracellulaire induite par l'hypoxie, sur la qualité de cette signalisation. En effet, l'héparanase est la seule enzyme dégradant les héparanes sulfates (HS) des protéoglycanes. Ces composés sont connus pour être des réservoirs inactifs de molécules biologiques comme les facteurs de croissance dont l'HGF/SF. De ce fait, en dégradant les HS, l'HGF/SF peut être libéré. Ce relargage pourrait mener à une activation du récepteur MET. Néanmoins, l'héparanase n'étant active qu'à un pH acide, nous avons cherché à savoir si l'hypoxie pouvait contribuer à l'acidification du milieu extracellulaire. Notre hypothèse initiale était que cette acidification puisse permettre une plus forte activité de l'héparanase, un plus grand relargage de l'HGF/SF et donc une plus forte activation de la signalisation HGF/SF-MET.

C'est en exploitant des systèmes de culture cellulaire en conditions hypoxiques ainsi que des systèmes de mesure précis et innovants du pH et de la pO_2 (système

PreSens®) dans des conditions de culture cellulaire avec des paramètres parfaitement contrôlés et définis (atmosphère, humidité, température, acidification du milieu...) que nous avons voulu répondre à ces questions.

Interconnexion entre l'héparanase et la CAIX :

Dans un premier temps, nous nous sommes assurés de l'état hypoxique des cellules lorsqu'elles sont placées dans la station d'hypoxie ($pO_2 = 1\%$). Pour cela, nous avons effectué une cinétique d'expression de la CAIX, un marqueur d'induction de l'hypoxie (HIF1a dépendant). Ces résultats montrent que dès 4 heures d'incubation en condition hypoxique, l'expression de la CAIX est fortement augmentée et cette expression s'accroît au fur et à mesure du maintien en hypoxie. En parallèle, nous avons analysé l'expression de l'héparanase dans nos lignées HT1080 et HT1080 surexprimant l'héparanase (HT1080 HPSE+). Comme attendu, les cellules HT1080 HPSE+ surexpriment massivement l'héparanase, alors que les cellules sauvages présentent un niveau d'expression faible et qui ne semble pas être directement modulé par l'état d'hypoxie. Cependant, de manière inattendue, nos résultats montrent que l'expression de la CAIX est fortement réprimée chez les HT1080 surexprimant l'héparanase. Ceci suggère l'existence d'une régulation croisée entre ces deux enzymes. Ces observations ont par ailleurs été confirmées par WB où on observe bien le défaut d'expression de la CAIX dans les HT1080 surexprimant l'héparanase. Ce résultat n'a jamais été observé auparavant. Il est difficile de déterminer si l'interaction entre CAIX et héparanase serait dépendante ou pas de HIF1a. Néanmoins, il semble que le premier niveau de régulation soit au niveau de l'expression génique puisque les expériences de RTqPCR montrent que les ARNm de la CAIX sont moins exprimés dans les cellules surexprimant l'héparanase. Une interaction directe entre ces deux enzymes serait également envisageable. En effet, la CAIX contient un domaine *proteoglycan-like* (Chiche et al 2010a) qui pourrait être dégradé par une héparanase active.

Conséquences de la surexpression de l'héparanase sur la morphogenèse de branchement :

Par la suite, nous avons étudié le comportement morphologique de nos cellules en matrice de Matrigel™. Nous avons remarqué une différence d'organisation des réseaux en culture normoxique entre les HT1080 et celles surexprimant l'héparanase. En effet les HT1080 HPSE+ tendent à se regrouper pour former des agrégats compacts et rigides alors que les HT1080 forment des réseaux et s'étendent sur toute la surface du puits de culture. En revanche, en hypoxie, les HT1080 HPSE+ tendent à retrouver un comportement ressemblant à celui des cellules sauvages. Ce phénomène est peu ou pas modifié en présence de stimulation par de l'HGF/SF. Ces observations suggèrent un effet fort de l'hypoxie, et ce indépendamment de la présence de l'HGF/SF. Nous formulons l'hypothèse qu'une surexpression de l'héparanase pourrait mener à une forte dégradation de la matrice extracellulaire et donc modifier la motilité des cellules et leur organisation. Cette modification serait visible en conditions hypoxiques du fait d'une plus forte activité de l'héparanase. Néanmoins, la contribution exacte de l'activité enzymatique de l'héparanase n'est pas encore démontrée et nécessitera l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou la génération d'une lignée surexprimant une héparanase mutée inactive.

Etude de l'acidification extracellulaire :

Le système PreSens® nous a permis de monitorer l'acidification du milieu extracellulaire par nos cellules cultivées dans des milieux à différents pH. Nous observons d'une part que les cellules peuvent proliférer à un pH<7, et d'autre part que les milieux que nous avons préparé à différents pH nous permettent d'atteindre des pH suffisamment acides pour favoriser l'activité de l'héparanase. On remarquera également que les cellules HT1080 surexprimant l'héparanase, mais qui perdent l'expression de la CAIX, acidifient plus rapidement le milieu extracellulaire que les cellules contrôles suggérant que le rôle de la CAIX dans l'acidification serait marginal. En effet, il a été démontré qu'en conditions hypoxiques, les cellules développaient des systèmes de régulation du pH supplémentaires comme l'expression des anhydrases carboniques et notamment l'isoforme CAIX, qui, de part son activité, restaure une alcalinité

intracellulaire. Les CA transmembranaires comme la CAIX catalysent la réaction entre le CO_2 et les molécules d'eau pour donner des protons (H^+) et du bicarbonate (HCO_3^-) ce qui mène à l'acidification du milieu extracellulaire. Les bicarbonates entrent par la suite dans la cellule par des transporteurs de bicarbonates spécifiques et se lient aux protons intracellulaires pour donner des molécules d'eau et du CO_2 par des réactions catalysées par des CA cytosoliques (comme la CAII). Le CO_2 sort alors de la cellule par diffusion passive et se lie aux molécules d'eau alimentant ainsi tout le processus. Toutes ces réactions ont pour but de diminuer la quantité de protons intracellulaires mais mènent à l'acidification du milieu extracellulaire. Néanmoins, nos résultats suggèrent que l'implication de la CAIX dans l'acidification du milieu extracellulaire serait marginale. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux établis précédemment. En effet, la régulation du pH intra et extracellulaire et l'acidification du milieu extracellulaire sont des processus qui impliquent de nombreux acteurs, et le rôle de chacun d'entre eux individuellement ne semble pas critique. Une étude a démontré que le *knockdown* de *ca9* ne perturbe pas la régulation du pH ou l'acidification du milieu extracellulaire du fait de la compensation de cette perte par l'activité et l'expression (au niveau du ARNm et des protéines) de la CAXII ainsi que d'autres isoformes (comme la CAII) (Chiche et al 2009, Gut et al 2002, Leppilampi et al 2005).

Effets de la surexpression de l'héparanase et de la modification du pH sur la signalisation HGF/SF-MET :

Par ailleurs, nous avons voulu évaluer le rôle du pH extracellulaire dans la régulation de la signalisation HGF/SF-MET, à la fois en normoxie et en hypoxie. Les cellules HT1080 (surexprimant ou non l'héparanase) ont été cultivées dans différents milieux à pH définis et placées en conditions de normoxie et d'hypoxie contrôlées puis stimulées par de l'HGF/SF. Nous n'avons pas observé de différences notables dans l'activation des voies de signalisation entre les cellules HT1080 et HT1080 HPSE+, suggérant que la modification de la matrice extracellulaire par l'héparanase ne modifie pas l'activation induite par l'HGF/SF. Cependant, au cours de ces expériences, nous avons noté une baisse drastique de la phosphorylation de MET en hypoxie suite à une stimulation par de l'HGF/SF dans les deux types cellulaires. Cette baisse a été observée quel que soit le pH utilisé.

Ainsi, ces résultats montrent que la surexpression de l'héparanase ou la modification du pH des milieux utilisés ne semblent pas avoir d'effets sur la signalisation HGF/SF-MET. En revanche, l'hypoxie semble jouer un rôle régulateur important et encore non décrit sur la phosphorylation du récepteur. Nous nous sommes donc concentrés sur cet aspect pour la suite de ma thèse.

Effets de l'hypoxie sur la signalisation HGF/SF-MET :

La première étape dans l'activation du récepteur MET est sa *trans*-autophosphorylation sur des résidus tyrosine cruciaux, notamment les tyrosines 1234 et 1235 au niveau du domaine kinase. Après cette étape initiale, MET est phosphorylé sur les tyrosines 1349 et 1356 au niveau du domaine C-terminal, qui constitue un site d'amarrage pour divers substrats impliqués dans la signalisation en aval. La phosphorylation de la tyrosine 1003 au niveau du domaine juxtamembranaire est quant à elle nécessaire pour une dégradation efficace du récepteur activé et l'arrêt de son signal. Nous avons démontré que la phosphorylation de tous ces résidus tyrosine de MET est réduite de manière drastique dans des conditions hypoxiques sans modifier la cinétique d'activation du récepteur alors que l'activation des voies de signalisation en aval AKT et ERK reste inchangée. En conséquence, les réponses biologiques induites par l'HGF/SF comme la morphogénèse, la dispersion, la migration et la survie sont conservées en hypoxie.

Par ailleurs, et suite à l'utilisation de siRNA ciblant MET et d'autres ciblant GAB1, nous avons montré que l'activation de AKT et ERK dépend bien de l'activation du récepteur et de son principal partenaire. En effet, l'extinction de MET a inhibé l'activation de AKT et ERK suite à une stimulation par de l'HGF/SF. Cette inhibition a également été observée avec des TKI ciblant MET (PHA-665752 et SU11274) utilisés à des doses importantes de façon à contourner le phénomène de résistances dont je discuterai ultérieurement. Quant à l'extinction de GAB1, elle a également mené à l'inhibition de ces deux voies de signalisation avec néanmoins un effet moins marqué sur ERK.

Nous observons donc que l'hypoxie induit une diminution importante de la phosphorylation de MET et de GAB1 alors que les voies de signalisation en aval AKT et ERK sont conservées. Cependant, MET et GAB1 restent nécessaires à l'activation de ces voies.

Effet de l'hypoxie sur les réponses cellulaires suite à une stimulation par l'HGF/SF :

La signalisation HGF/SF-MET est impliquée dans l'induction d'un grand nombre de réponses cellulaires comme la morphogénèse, la dispersion, la migration et la survie (Furlan et al 2014, Skead and Govender 2015). Toutes ces réponses sont induites par l'HGF/SF de façon comparable en normoxie et en hypoxie, ce qui est cohérent avec l'activation dans les deux cas des voies de signalisation en aval, et ce malgré la baisse drastique de la phosphorylation du récepteur. Ces résultats suggèrent qu'une activation minimale de MET et de GAB1, en conditions hypoxiques, est suffisante pour promouvoir un ensemble de réponses biologiques efficaces. De façon intéressante, il a récemment été montré dans des lignées cellulaires présentant une activation constitutive de MET qu'une inhibition de l'activité du récepteur par des TKI pouvait être très efficacement court-circuitée par un traitement avec l'HGF/SF. Dans ces conditions, le récepteur est capable de recruter GAB1 pour relayer l'activation des voies de signalisation. Ainsi, malgré une inhibition de MET efficace, l'ajout d'HGF/SF pourrait activer le peu de MET non inhibé ce qui serait suffisant pour induire la survie cellulaire (Pennacchietti et al 2014). Ceci démontre qu'une mobilisation réduite du récepteur par son ligand est capable d'induire des réponses efficaces grâce à l'amplification du signal en aval.

En effet, dans notre étude, une activation efficace des voies de signalisation malgré la diminution de la phosphorylation de MET suggère l'existence d'une amplification du signal. Contrairement à ce qui a été montré dans l'étude de Pennacchietti et ses collaborateurs, cette amplification aurait lieu en aval de GAB1 mais en amont de AKT et de ERK.

Effet de l'hypoxie sur la prolifération cellulaire :

Contrairement aux réponses de migration, de dispersion, de survie ou de morphogénèse, l'hypoxie semble affecter la prolifération des cellules que nous avons utilisées. En effet, les MCF10A, MDCK et GTL16 ont présenté une baisse de la prolifération en hypoxie et ce avec ou sans stimulation par l'HGF/SF. Un résultat similaire a été obtenu dans une étude récente sur le récepteur MET (Lee et al 2014). En revanche, certaines différences sont à noter entre nos deux études. En effet, la baisse de prolifération des cellules dans l'étude de Lee et ses collaborateurs a été observée suite à une stimulation par de l'HGF/SF. De plus, ce résultat a été observé suite à l'utilisation de mimétiques de l'hypoxie (CoCl₂) et non pas en conditions d'hypoxie réelle. Par ailleurs, dans leur étude, Lee et son équipe ont suggéré que la baisse de prolifération des cellules en hypoxie était due à une baisse de l'activation de la voie AKT que nous n'avons pas observé dans nos conditions.

De façon plus générale, la baisse de prolifération en hypoxie a été montrée dans plusieurs lignées cellulaires comme les kératinocytes, les fibroblastes embryonnaires ou encore une grande variété de cellules cancéreuses (comme des cellules issues du carcinome colorectal, cervical et rénal). En effet, l'augmentation du nombre de cellules a pour conséquence une augmentation de la demande en oxygène dissous et donc à une augmentation du stress hypoxique. Par ailleurs, différentes études ont souligné l'impact de HIF1a sur la prolifération cellulaire du fait de son action sur l'augmentation de l'expression de gènes d'inhibiteurs de la *Cycline-Dependant Kinase* (CDK) (p21, p27 ou les deux). D'autres études ont démontré que HIF1a pouvait agir directement et de manière indépendante de son activité transcriptionnelle. En effet, en réponse à l'hypoxie, HIF1a se lie à Cdc6 (*Cell division cycle 6*), une protéine essentielle dans la réplication de l'ADN, et favorise son interaction avec le complexe MCM (*Mini Chromosome Maintenance*) menant à une baisse de la réplication de l'ADN et à l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire (Hubbi et al 2013, Hubbi and Semenza 2015). En conclusion, il semble que la baisse de prolifération observée dans nos expériences ne soit pas liée à la baisse de phosphorylation du récepteur MET.

Hypoxie « vraie » vs mimétiques de l'hypoxie :

Alors que l'expression de MET ainsi que son activation ont déjà été explorées en hypoxie (Ide et al 2006, Lee et al 2014, Pennacchietti et al 2003), une telle baisse dans la phosphorylation de MET n'a jamais été décrite auparavant. Jusqu'à maintenant, la phosphorylation du récepteur a été évaluée après un traitement par du CoCl_2 , un composé souvent utilisé comme « mimétique de l'hypoxie ». En effet, l'ion cobalt contenu dans ce composé mène à une stabilisation de HIF1a en entrant en compétition avec le fer, co-facteur des Proxyl Hydroxylases (PHD), enzymes responsables de l'hydroxylation de HIF1a. De ce fait, les mimétiques de l'hypoxie comme le CoCl_2 ou l'hydralazine empêchent l'hydroxylation de HIF1a, son ubiquitination et donc sa dégradation (Epstein et al 2001, Hoenig et al 2008, Knowles et al 2004).

Notre travail a démontré que contrairement à la carence en oxygène qui diminue la phosphorylation de MET, l'utilisation de mimétiques de l'hypoxie ne mène pas à cette réponse puisqu'un traitement au CoCl_2 et à l'hydralazine ne diminue pas la phosphorylation du récepteur. Des différences entre la baisse de pression en oxygène et le traitement par le CoCl_2 ont déjà été décrites. En effet, une étude a démontré que l'expression de la HO-1 (*Heme oxygenase 1*) est réprimée en hypoxie alors qu'elle est augmentée par le CoCl_2 , démontrant ainsi des effets inverses entre une baisse de la pression en oxygène et le CoCl_2 (Nakayama et al 2000).

Même si nos observations s'effectuent dans une situation totalement différente, il est également intéressant de noter qu'une étude a démontré qu'une phosphorylation constitutive du récepteur MET est possible suite à une inactivation du gène *vhl* (et donc à une accumulation de HIF1a) dans des cellules issues du cancer du rein (CCRC). Cette activation constitutive a par ailleurs mené à une augmentation de la croissance tumorale. Ces résultats suggèrent l'existence probable d'une interaction entre HIF1a et la phosphorylation de MET en absence de son ligand dans le CCRC. En effet, une inactivation de *vhl* mène à une accumulation de HIF1a qui mènerait à une surexpression de MET et donc à son activation constitutive. Néanmoins, la phosphorylation constitutive de MET a été inhibée avec la présence d'un gène sauvage *vhl* exogène, dans des cellules confluentes, sans diminution de l'expression de MET. Ceci démontre qu'il y a

probablement d'autres mécanismes impliqués mais qui sont encore inconnus (Nakaigawa et al 2006).

Effet de l'hypoxie sur l'activation de MET et le recrutement de GAB1 :

Le phénomène de baisse de la phosphorylation de MET touche plusieurs tyrosines. D'une part, les tyrosines 1234 et 1235 du domaine kinase nécessaires à l'activation du récepteur et qui sont donc indicatrices de son activation. Ainsi, nous avons quantifié le niveau de phosphorylation du récepteur dans les GTL16 en utilisant la technologie AlphaScreen® et avons pu démontrer une baisse de près de 60% de cette phosphorylation. Il serait maintenant intéressant de mesurer l'activité kinase du récepteur en évaluant sa capacité à phosphoryler un substrat par exemple par incorporation de P32 radioactif. L'évaluation de l'activité kinase se fait en détectant la phosphorylation du substrat cible par radioactivité ou par des anticorps anti phosphotyrosine.

La baisse de phosphorylation des tyrosines du domaine kinase est accompagnée de celle de la tyrosine 1349 du domaine C-terminal. Cette tyrosine est nécessaire au recrutement de partenaires comme GAB1 qui joue le rôle d'une plateforme de phosphorylation et est responsable de l'amplification du signal de MET. La baisse de phosphorylation de cette tyrosine mène donc de façon attendue à une baisse de la phosphorylation de GAB1 probablement suite à un recrutement moins efficace par la Y1349. Néanmoins, puisque les voies AKT et ERK sont activées efficacement malgré la diminution de phosphorylation de MET et GAB1 et puisque des siRNA ciblant MET et GAB1 inhibent ces voies, il est envisageable qu'une faible activation de GAB1 soit suffisante pour une amplification efficace du signal. Par ailleurs, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que malgré la diminution de sa phosphorylation, MET puisse recruter efficacement d'autres protéines de signalisations connues ou inconnues jusqu'à présent, capable d'amplifier le signal. Ces protéines de signalisation pourraient également être activées par un éventuel partenaire de MET, activé en hypoxie et prenant le relai du récepteur. En effet, il est également envisageable que MET n'agisse pas seul. Nous pouvons supposer qu'en conditions hypoxiques, MET interagit avec une protéine

de signalisation capable de jouer le rôle de relais et d'activer les voies de signalisation en aval. Il pourrait par exemple s'agir de récepteurs comme l'EGFR, le VEGFR2 ou le CD44. Concernant l'EGFR, nos expériences tendent à exclure son implication. En effet, une stimulation par l'HGF/SF ne permet pas d'activer l'EGFR en conditions hypoxiques, suggérant qu'il ne serait pas impliqué dans l'activation des voies de signalisation en aval en tant que relai de MET. Il serait maintenant intéressant d'étudier l'implication des autres récepteurs ainsi que d'autres partenaires capables d'agir comme relais. De ce fait, on pourrait évaluer l'activation de certains RTK suite à une stimulation par l'HGF/SF. De plus, des expériences de co-immuno-précipitation pourraient également apporter quelques éléments de réponse.

Effet de l'hypoxie sur l'internalisation de MET :

Enfin, la tyrosine 1003 du domaine juxtamembranaire est également touchée par cette diminution de la phosphorylation. Cette tyrosine est nécessaire à l'internalisation du récepteur activé et à sa dégradation suite au recrutement de la protéine c-CBL, une E3 ubiquitine ligase. Pour déterminer si la baisse de phosphorylation de cette tyrosine avait une conséquence, nous avons analysé l'internalisation du récepteur après activation avec un anticorps monoclonal anti-MET (5D5). En effet, le 5D5 est un anticorps reconnaissant le région extracellulaire de MET. La fixation de l'anticorps induit la dimérisation du récepteur, son activation et son internalisation. Cette internalisation, suivie en immunofluorescence, a été réduite en hypoxie. En effet, après 1h et 2h de traitement, nous avons remarqué une baisse du nombre de vésicules d'internalisation en hypoxie. Cependant, la dégradation de MET ne semble pas être modifiée. En effet, la demi-vie de MET ne semble pas significativement différente en hypoxie comparée à la normoxie en présence de cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique qui agit en bloquant les phases d'initiation et d'élongation. Ceci suggère que le récepteur n'est pas moins dégradé malgré une internalisation réduite.

Ainsi, il est possible qu'une baisse de la phosphorylation de la tyrosine 1003 conduise à une altération du recrutement de c-CBL et donc à une baisse de l'internalisation de MET et de son ubiquitination. Il serait donc intéressant d'évaluer le recrutement de c-CBL par MET soit en réalisant des co-immuno-précipitations ou en

réalisant un « *pull-down* » avec une protéine purifiée contenant le domaine SH2 de c-CBL (SH2-CBL) couplé à la GST (*Glutathione S Transferase*) (Hong et al 2013).

Bien que nous n'ayons pas montré de différence de demi-vie de MET en hypoxie, plusieurs études ont décrit une surexpression de MET en conditions hypoxiques (Hayashi et al 2005, Ide et al 2006, Pennacchietti et al 2003, Scarpino et al 2004). En effet, il a été montré que l'hypoxie conduisait à une augmentation de l'expression de MET en conséquence de la stabilisation de HIF1a qui se fixerait sur deux sites de liaison situés dans la région promotrice de *met* (Pennacchietti et al 2003). Dans notre étude, nous n'avons observé aucune augmentation significative de l'expression de MET, que ce soit au niveau des ARNm ou des protéines, après 1 ou 24 heures d'hypoxie. Néanmoins, cette surexpression observée dans la littérature pourrait être en partie la conséquence du défaut d'internalisation que nous avons décrit. De plus, ce défaut d'internalisation pourrait permettre de maintenir la signalisation de MET et ce malgré une faible activation du récepteur.

Ainsi, il semble que seule l'internalisation du récepteur soit affectée pendant l'hypoxie suite à la baisse de la phosphorylation de la tyrosine Y1003.

Par ailleurs, comme indiqué dans l'introduction (page 36), il est maintenant clairement établi que MET induit des voies de signalisation différentes au cours de son internalisation et en fonction de sa localisation (membrane cellulaire, endosome périphérique ou péri-nucléaire) (Menard et al 2014). Il est donc possible qu'une altération de son internalisation ait une conséquence sur l'activation de ces voies. Ainsi, il serait intéressant d'étudier ces voies en bloquant l'internalisation de MET. Il serait également intéressant de réaliser des co-marquages avec des marqueurs des endosomes comme Rac1 ou encore d'étudier la cinétique d'activation de STAT3 à des temps longs de stimulation par de l'HGF/SF et analyser l'éventuelle présence de différences entre les conditions normoxiques et hypoxiques. En effet, nous faisons l'hypothèse qu'une moindre internalisation maintient le signal de MET avec une activation maintenue des voies AKT et ERK. Néanmoins, vu que d'autres voies sont activées quand MET est internalisé, il serait intéressant de déterminer si ces protéines de signalisation sont moins activées du fait d'une moindre internalisation du récepteur.

Recherche du mécanisme conduisant à la baisse de la phosphorylation de MET :

Rôle de l'interaction HGF/SF-MET ?

L'une des raisons permettant d'expliquer la diminution de la phosphorylation du récepteur MET est une action de l'hypoxie sur l'interaction entre MET et l'HGF/SF. Nous avons donc induit l'activation de MET par trois types d'agonistes. Soit de l'HGF/SF mature et recombinant, soit du surnageant de fibroblastes (MRC5) qui secrètent naturellement du pro-HGF/SF qui est par la suite maturé naturellement pour donner de l'HGF/SF mature et actif ou soit un agoniste synthétique, le sous domaine K1 de l'HGF/SF synthétisé chimiquement au laboratoire et couplé à la streptavidine (K1B/S) et qui a démontré une forte capacité à lier MET et à l'activer (Simonneau et al 2015). Dans tous les cas nous avons observé une diminution de la phosphorylation de MET excluant de ce fait tout défaut lié à la maturation de l'HGF/SF ou à sa disponibilité vis-à-vis de MET. Cependant, ces expériences ne nous permettent pas d'exclure un défaut de liaison de l'HGF/SF sur MET en hypoxie.

Nous avons donc utilisé des lignées cellulaires surexprimant MET suite à une amplification génique (cellules GTL16 et EBC-1) ou suite à une délétion de l'exon 14 menant à une réduction de l'internalisation et de la dégradation du récepteur (cellules HS746T). Nous avons obtenu une baisse importante de la phosphorylation de MET dans ces trois lignées cellulaires.

Ces résultats suggèrent que la cause de la baisse de phosphorylation du récepteur n'est pas liée à un défaut de liaison de l'HGF/SF. En effet, dans ces trois lignées issues de différents cancers, l'activation de MET se fait par dimérisation indépendante du ligand due à sa surexpression, conduisant ainsi à leur *trans*-activation. De ce fait, la baisse de phosphorylation du récepteur dans ce type de lignées exclut un défaut lié à l'HGF/SF ou à sa fixation sur MET. Néanmoins, il serait intéressant de confirmer l'absence d'un défaut d'interaction avec un argument expérimental direct en évaluant par exemple l'interaction ligand-récepteur. Par exemple, il serait possible d'entreprendre des expériences d'associations en utilisant un HGF/SF marqué (*Ligand Binding Assays*) et vérifier ainsi sa capacité à se lier au récepteur en normoxie et en hypoxie.

Rôle de la sérine 985 ?

Nous avons ensuite cherché à mettre à jour d'autres mécanismes pouvant être impliqués dans cette régulation de la phosphorylation de MET, en gardant à l'esprit la dynamique et la réversibilité du mécanisme impliqué. En effet, nous savons que ce mécanisme est indépendant de HIF1a puisque l'utilisation de stabilisateurs de HIF1a (CoCl₂ et hydralazine) n'ont pas permis d'induire une baisse de phosphorylation de MET. Néanmoins, il faudrait consolider ces résultats en utilisant par exemple des siRNA ciblant HIF1a ou des cellules exprimant une forme inactive de VHL (comme les cellules issues de cancer rénal Caki-2) afin d'exclure toute implication de HIF1a dans la baisse de phosphorylation de MET en hypoxie.

Nous avons donc voulu rechercher les mécanismes rapides et réversibles pouvant expliquer la baisse de phosphorylation de MET en hypoxie. Nous avons commencé par étudier la sérine 985 du domaine juxtamembranaire de MET. Cette sérine est phosphorylée par les PKC δ et ϵ et elle est déphosphorylée par la phosphatase PP2A. La phosphorylation de la sérine 985 est induite par une stimulation par l'HGF/SF mais dépend également du contexte cellulaire. Par exemple, il a été démontré que cette sérine est phosphorylée en condition de stress oxydant indépendamment du ligand. La phosphorylation de cette sérine régule négativement l'activité tyrosine kinase du récepteur suite à son activation par l'HGF/SF (Gandino et al 1994, Hashigasako et al 2004).

Nous avons donc voulu déterminer si l'inhibition des PKC par des inhibiteurs spécifiques (BIM I et G06983) permettait de restaurer une phosphorylation du récepteur en hypoxie suite à une inhibition de la phosphorylation de la sérine 985. Nous avons montré que la phosphorylation de MET n'est pas restaurée par ces inhibiteurs de PKC suggérant que la phosphorylation de la sérine 985 n'est pas impliquée. Pour conforter ce résultat, nous avons utilisé la lignée cancéreuse gastrique HS746T présentant une délétion de l'exon 14 de *met*. Comme je l'ai décrit précédemment, une délétion de l'exon 14, qui code une partie du domaine juxtamembranaire de MET, induit un défaut de dégradation du récepteur suite à l'absence de recrutement de c-CBL. Cependant, ce domaine comprend également la sérine 985. Nous avons montré que

comme pour les autres types cellulaires, l'hypoxie induit une diminution importante de la phosphorylation de MET dans les cellules HS746T. Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que la sérine 985 n'est pas impliquée dans la diminution de la phosphorylation de MET pendant l'hypoxie.

Rôle des phosphatases ?

Plusieurs phosphatases sont impliquées dans la régulation de la signalisation HGF/SF-MET dont Shp-2, DEP-1 et PTP1B et certaines sont capables de déphosphoryler directement le récepteur (Maroun et al 2000, Palka et al 2003, Sangwan et al 2008). Etant donné le caractère dynamique et réversible de la déphosphorylation de MET pendant l'hypoxie, nous avons émis l'hypothèse d'une implication possible des phosphatases dans cette diminution.

Nous avons en premier lieu utilisé l'orthovanadate de sodium, un inhibiteur général des tyrosines phosphatases. Nous avons observé une forte phosphorylation du récepteur MET en normoxie. De même, en hypoxie, le récepteur est fortement activé avec une augmentation de la phosphorylation équivalente à celle observée en normoxie. Ceci suggère que les phosphatases joueraient un rôle dans la régulation de la phosphorylation de MET. Néanmoins, l'orthovanadate de sodium inhibe non seulement toutes les tyrosines phosphatases mais également les phosphatases alcalines et acides ainsi que certaines ATPases (Na^+/K^+ ATPases) vraisemblablement en agissant comme un analogue du phosphate. Par ailleurs, nous remarquons que la phosphorylation de MET en présence de ce composé est bien plus élevée que suite à une stimulation par de l'HGF/SF seul suggérant que ce composé agit sur d'autres mécanismes qui indirectement mènent à une phosphorylation de MET. L'utilisation de ce composé ne peut donc qu'être qu'indicative.

De ce fait, puisqu'il avait été démontré que PTP1B et Shp-2 sont impliquées dans la déphosphorylation de MET ou dans la régulation de sa signalisation, nous avons évalué l'effet d'inhibiteurs spécifiques de ces deux phosphatases sur la phosphorylation de MET en hypoxie.

Malheureusement, dans nos expériences, les inhibiteurs de PTP1B et Shp-2 n'ont pas permis de restaurer la phosphorylation de MET en hypoxie, suggérant que ces deux phosphatases ne soient pas impliquées. Ces résultats sont cohérents avec des études précédentes suggérant que l'activité de certaines phosphatases comme PTP1B et Shp-2 (ainsi que DEP-1 et T-cell PTP) est diminuée en conditions hypoxiques due à une oxydation de leur domaine catalytique (Sandin et al 2011, ten Freyhaus et al 2011). Il serait de ce fait intéressant d'évaluer l'implication d'autres phosphatases dont l'activité serait au contraire induite pendant l'hypoxie. A cet effet, nous avons analysé l'activité générale des phosphatases en normoxie et en hypoxie en utilisant la technique du *Tyrosine Phosphatase Assay System*® qui se base sur la méthode colorimétrique au vert de malachite. Nous n'avons pas pu montrer de différences significatives d'activité phosphatase entre la normoxie et l'hypoxie. Néanmoins, si la déphosphorylation de MET en hypoxie est due à l'action d'une seule phosphatase dont l'activité serait augmentée en hypoxie, elle aurait difficilement pu être détectable parmi l'ensemble des tyrosines phosphatases. Il serait de ce fait utile d'utiliser d'autres méthodes d'investigation comme l'extinction individuelle des phosphatases par siRNA. A cet effet, Dharmacon® propose une librairie de siRNA ciblant 254 phosphatases humaines. Il serait intéressant d'utiliser les siRNA ciblant les tyrosines phosphatases en plaque 96 puits et de mesurer leur effet sur la phosphorylation du récepteur en AlphaScreen®.

Effets de l'hypoxie sur l'établissement de résistances aux TKI ciblant MET :

Comme décrit dans l'introduction, l'hypoxie a un effet opposé sur les cellules. D'un côté, le manque d'oxygène en tant que tel peut induire une réponse au stress et déclencher la mort des cellules, et d'un autre côté, l'hypoxie induit un large éventail de réponses adaptatives qui favorise leur survie. L'hypoxie est donc de mauvais pronostic dans une grande variété de tumeurs. En effet, elle est associée à une moins bonne survie des patients atteints de cancers cervicaux, de cancers des voies aérodigestives supérieures ou de sarcomes. De plus, il a été montré que l'hypoxie jouait un rôle primordial dans la progression tumorale (Vaupel and Mayer 2007). Par ailleurs, il est maintenant clairement établi que l'hypoxie intratumorale induit une réponse adaptative complexe menant notamment à une chimiorésistance, que ce soit envers des agents cytotoxiques (comme la cisplatine ou la doxorubicine) (Doktorova et al 2015) ou des

thérapies ciblées (comme le géfitinib) (Murakami et al 2014).

Un grand nombre de stratégies pour l'inhibition de l'activité des RTK sont en cours de développement ou utilisées en clinique pour le traitement du cancer. Beaucoup de ces inhibiteurs de tyrosine kinase sont des mimétiques de l'ATP. Ces molécules, comme décrites dans le chapitre I, se lient au site de liaison de l'ATP du domaine kinase des RTK. De manière contre-intuitive, il a été montré que les mimétiques de l'ATP sont plus actifs quand le récepteur est activé. En effet, quand le site catalytique de la kinase est en une conformation ouverte, donc actif, l'ATP-mimétique s'y fixe et empêche la fixation de l'ATP, inhibant ainsi l'activité kinase du récepteur (Chen 2011). Par exemple, des TKI ciblant l'EGFR comme le géfitinib sont plus actifs contre des variants de l'EGFR avec des mutations activatrices. Ainsi, ce TKI a une activité 20 fois plus élevée contre un mutant L858R du récepteur que contre la version sauvage (Yun et al 2007).

Concernant le récepteur MET, il a été montré qu'une grande sensibilité au TKI SGX523 (Lily Pharmaceuticals®) est associée à un niveau élevé de la forme phosphorylée du récepteur (donc de la forme active). Cette étude a été effectuée dans des lignées cellulaires issues de glioblastomes stimulées par de l'HGF/SF de manière autocrine (Xie et al 2012). Cette observation semble démontrer que les TKI ciblant MET sont plus efficaces quand le récepteur est activé, même si cette démonstration n'est pas aussi directe que celle pour l'EGFR.

De ce fait, la forte diminution de la phosphorylation de MET observée en hypoxie pourrait modifier les réponses aux TKI. Nous avons donc utilisé deux ATP-mimétiques PHA-665752 et SU11274. Nous avons constaté que pour une inhibition de AKT et de ERK équivalente à celle obtenue en normoxie, il est nécessaire d'utiliser des concentrations plus élevées en hypoxie. Par la technologie AlphaScreen®, qui permet une mesure quantitative de la phosphorylation de ERK et AKT, nous avons estimé que l'IC50 du PHA-665752 est 2.1 fois supérieure en hypoxie pour l'inhibition de la phosphorylation d'AKT et 2.4 fois supérieure concernant ERK. Cette résistance immédiate est très rapidement réversible (au bout de 10 minutes) après retour des cellules en conditions normoxiques (réoxygénation). Ceci démontre que la résistance à ces TKI, tout comme la forte baisse de la phosphorylation de MET, est un phénomène à

la fois immédiat et dynamique mais également réversible. Néanmoins, et malgré l'association claire entre les résistances et le statut de phosphorylation de MET en hypoxie et en réoxygénation, nous n'avons pas de preuve directe permettant de lier la résistance à la baisse de phosphorylation de MET. En revanche, le fait de trouver le mécanisme menant à la baisse de phosphorylation du récepteur en hypoxie pourrait nous permettre d'apporter une preuve directe liant cette baisse de phosphorylation à une résistance aux TKI. En effet, nous pourrions inverser ce mécanisme et observer si on arrive à récupérer l'efficacité des TKI en hypoxie.

Ces résultats originaux sont à mettre en perspective avec ceux décrits dans la littérature concernant les résistances aux thérapies en conditions hypoxiques. En effet, classiquement, les résistances décrites sont des réponses résultantes d'une reprogrammation génétique profonde impliquant principalement HIF1a. Par ailleurs, d'autres phénomènes ont également été décrits n'impliquant pas ce facteur de transcription (Doktorova et al 2015). Mais qu'ils soient dépendants ou non de HIF1a, ces mécanismes de résistances ne sont pas immédiats puisqu'ils nécessitent au moins une régulation transcriptionnelle. En revanche, dans notre étude, l'effet observé est immédiat et témoigne d'une résistance rapide ne nécessitant pas *a priori* de régulations géniques. Afin d'exclure toute implication de HIF1a dans les résistances observées dans notre étude, nous pourrions envisager de quantifier cette résistance en présence de stabilisateurs de HIF1a. Néanmoins, ces expériences seront à analyser avec prudence du fait des conséquences sur les cellules de l'utilisation de produits chimiques mimétiques de l'hypoxie ou de lignées cellulaires invalidées pour VHL.

Par ailleurs, nous avons testé l'effet du crizotinib, un autre TKI ciblant MET. Aucune résistance significative en hypoxie n'a été observée avec cet inhibiteur. Ce résultat est intéressant et intrigant du fait de l'appartenance du crizotinib à la catégorie des TKI inhibiteurs ATP-compétitifs.

Ces résultats pourraient cependant s'expliquer par la structure chimique de ces composés dont l'action en fonction du statut de phosphorylation de MET pourrait être différente. En effet, le PHA-665752 et le SU11274 sont structurellement très proches et possèdent tous les deux un cœur indolin-2-one. Quant au crizotinib, il possède une

structure aminopyridine (figure 39). Cette différence pourrait suggérer que la résistance observée en hypoxie passerait probablement par des mécanismes dépendants des molécules, de leur structure ou de leur 'comportement' en hypoxie.

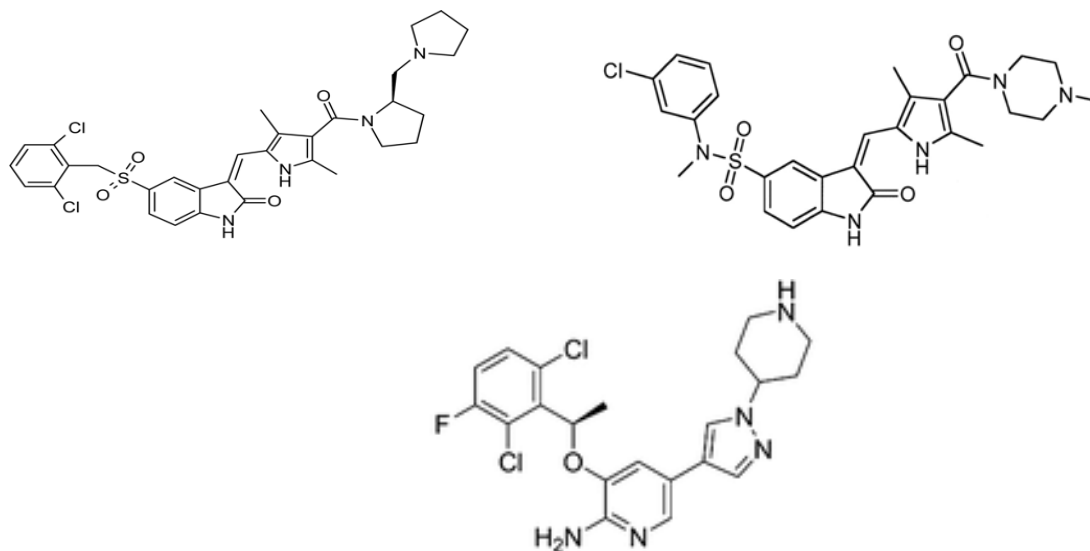


Figure 39 – Structures chimiques du PHA-665752, tiré de (Christensen et al 2003) (haut gauche), du SU11274, tiré de (Sattler et al 2003) (haut droite) et du crizotinib (PF 02341066), tiré de (Johnson et al 2014) (bas).

Par ailleurs, et comme mentionné dans l'introduction, l'activation de MET est impliquée dans la résistance aux thérapies ciblant d'autres RTK comme l'EGFR et le VEGFR. En effet, Sennino et ses collaborateurs ont démontré qu'un ciblage de la voie VEGF/VEGFR menait à une augmentation de l'hypoxie et de l'activité de MET, rendant ainsi nécessaire l'utilisation de thérapies ciblant à la fois le MET et le VEGFR (Engelman et al 2007, Sennino et al 2012). Néanmoins, nous observons dans mes travaux que l'hypoxie mène à une résistance aux TKI ciblant MET. Par conséquent, il est envisageable que le traitement avec les TKI ciblant MET, en association avec ceux ciblant le VEGFR, soit moins efficace en hypoxie réduisant ainsi l'effet de la double thérapie. L'utilisation de TKI, seuls ou en combinaisons thérapeutiques, serait donc à prendre avec précaution en évaluant au préalable leur efficacité en hypoxie par exemple.

Du fait de l'apparition systématique de résistances aux TKI, les combinaisons de traitement apparaissent donc comme des stratégies thérapeutiques envisageables.

Cependant, la séquence de administration de ces thérapies reste à déterminer. En effet, il est possible d'administrer la seconde thérapie au moment de la résistance. Néanmoins, il a été proposé qu'une administration combinatoire dès le début du traitement puisse être plus efficace en empêchant l'apparition de résistances éventuelles. Cette stratégie d'administration combinatoire initiale nécessite une anticipation du phénomène de résistance. De façon intéressante, il a été démontré que les amplifications de *met* menant à la résistance aux anti-EGFR sont préexistantes dans la tumeur avant traitement (Turke et al 2010). De ce fait, l'étude, pour chaque patient, de l'hétérogénéité de sa tumeur pourrait mener à une prédiction des éventuelles résistances. Ainsi, la combinaison des thérapies ciblées à utiliser pourrait être anticipée.

Effets de l'hypoxie sur la signalisation EGF/EGFR :

Nous avons cherché à déterminer si la baisse de phosphorylation de MET pouvait être observée pour d'autres RTK. Ainsi, nous avons comparé la phosphorylation de l'EGFR en conditions normoxiques et hypoxiques. Bien que l'effet soit moins marqué que pour MET, la phosphorylation de l'EGFR suite à une stimulation par l'EGF est plus faible en hypoxie. Cependant, comme pour MET, l'activation des voies de signalisation en aval AKT et ERK semble inchangée.

Ce point nécessite donc une analyse plus approfondie en comparant par exemple des cinétiques d'activation de MET et de l'EGFR en normoxie et en hypoxie. Plus globalement, il serait intéressant de déterminer l'état de phosphorylation des autres RTK en hypoxie, en utilisant notamment des techniques de *microarray*. En effet, nous pourrions envisager des expériences avec une stimulation de chaque récepteur tyrosine kinase par son ligand respectif et analyser sa phosphorylation en conditions hypoxiques. Ceci nous permettra d'avoir une vision plus globale sur l'activation des RTK en hypoxie ainsi qu'une comparaison des RTK entre eux quant à leur comportement dans ces conditions.

Vu la baisse de phosphorylation de l'EGFR en hypoxie, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'une résistance des TKI ciblant l'EGFR comme ce fût le cas pour MET. Nous avons donc testé le géfitinib, un TKI appartenant à la catégorie des ATP-

mimétiques. L'utilisation de cet agent a permis de démontrer qu'en hypoxie, une dose au moins deux fois plus élevée est nécessaire pour induire une action inhibitrice efficace contre AKT et ERK. Par ailleurs, comme pour MET, cette résistance immédiate est très rapidement réversible (au bout de 10 minutes) après retour des cellules en conditions normoxiques (réoxygénation). Ce résultat est également intéressant car, même si l'EGFR subit une baisse de phosphorylation en hypoxie, celle-ci est moins importante que celle de MET. Il serait de ce fait intéressant d'étudier avec plus de précision le phénomène de résistance au géfitinib en employant la technique de quantification AlphaScreen®. Par ailleurs, une étude généralisée sur tous les RTK serait intéressante dans le but de déterminer si les phénomènes de résistance touchent d'autres RTK que MET et l'EGFR.

Conséquences physiologiques de la baisse de phosphorylation de MET ?

Bien que nous ayons montré que la baisse de phosphorylation de MET durant l'hypoxie ait pour conséquence une résistance aux traitements ciblés anti-tumoraux, nous n'avons pas abordé ses possibles conséquences physiologiques.

Nous avons observé, dans certaines lignées et sans traitement préalable, une phosphorylation basale de AKT et ERK plus importante en condition d'hypoxie. Cette même observation a déjà été faite dans d'autres études (Karakashev and Reginato 2015, Yokoi and Fidler 2004). Ainsi, il semble que les voies de signalisation ERK et AKT soient plus activées en basal en hypoxie et soient donc plus facilement activable suite à une stimulation par un facteur de croissance par exemple. Dans ces conditions, nous pouvons formuler l'hypothèse qu'une baisse de la phosphorylation de MET pendant l'hypoxie soit un mécanisme de compensation pour éviter une activation trop importante des voies AKT et ERK pendant l'hypoxie.

En effet, il a été démontré que l'activation non contrôlée des oncogènes induit la mort cellulaire. En effet, la cellule maintient leur activation à un niveau qui ne lui est pas délétère (Martin et al 2014, Sawyers 2004, Weinstein and Joe 2006). De ce fait, on pourrait penser que la cellule maintient une activation minimale du récepteur MET, ce qui lui permet d'une part de « contrôler » son activation ainsi que celle des voies de signalisation à un niveau qui ne lui soit pas nocif. D'autre part, cette activation minimale

de MET permet également à la cellule de ne pas consommer trop d'énergie. En effet, la phosphorylation du récepteur et le recrutement de GAB1 mènent à une consommation d'ATP. De ce fait, une phosphorylation moindre serait un mécanisme d'adaptation supplémentaire à l'hypoxie. En conclusion, la baisse de phosphorylation de MET serait un mécanisme permettant une moindre consommation d'énergie par la cellule mais également un rétrocontrôle négatif permettant la régulation de l'activation des voies de signalisation en aval.

Conclusion et impact clinique :

Récemment, de nombreux TKI ciblant MET ont été utilisés de manière fructueuse dans des essais cliniques chez des patients avec des dérégulations de MET comme des amplifications géniques et des mutations activatrices menant à une perte de l'exon 14 régulateur (Frampton et al 2015, Liu et al 2015, Ou et al 2011, Paik et al 2015). De manière intéressante, nous avons observé une baisse de la phosphorylation de MET dans des lignées portant ces deux types de dérégulations (GTL16, EBC-1 et HS746T). Ceci suggère que la résistance aux TKI pourrait avoir lieu dans les zones hypoxiques des tumeurs portant ces dérégulations. En effet, nous avons montré dans des xénogreffes de tumeurs GTL16 que même si beaucoup de zones hypoxiques présentent un marquage pour phospho-MET en IHC, certaines d'entre elles présentent une absence de phosphorylation MET. Une réduction de l'efficacité des TKI ciblant MET est donc envisageable dans ces régions tumorales subissant l'hypoxie et la réduction de la phosphorylation du récepteur. Néanmoins, même si *in vitro* le PHA-665752 a montré une plus grande efficacité dans des lignées avec amplification génique de *met* ou délétion de l'exon 14, seul le crizotinib a montré cette efficacité en clinique. Or nous n'observons pas de résistances au crizotinib en hypoxie. Cependant, il existe d'autres TKI en développement (comme l'INC 280 - Novartis®) ou utilisés en clinique (comme le cabozantinib) dont il serait intéressant de tester l'efficacité en hypoxie. Par ailleurs, d'après nos résultats, l'utilisation en clinique de TKI de la même famille chimique que le PHA-665752 et le SU11274 aurait une efficacité limitée.

D'un autre côté, dans sa volonté d'améliorer les réponses aux traitements, la communauté scientifique cherche à mieux stratifier les patients afin de leur donner le traitement le plus adéquat possible. A cet effet, il est indispensable de trouver de bons biomarqueurs de diagnostic et de réponse aux traitements. Les biomarqueurs utilisés actuellement en clinique sont la surexpression de MET et son amplification génique. Néanmoins, ces deux méthodes ont certains inconvénients. En effet, il a été démontré que la surexpression de MET, qui est évaluée par IHC, ne correspond pas forcément à son activation. Par exemple, il a été démontré dans une étude que seulement 5% des cancers du poumon non à petites cellules présentent une phosphorylation de MET alors que sa surexpression est retrouvée dans 11% des cas (Tsuta et al 2012). L'utilisation de

la surexpression de MET comme biomarqueur peut donc mener à une surestimation des patients potentiellement répondeurs. De même, l'amplification génique de *met*, qui est évaluée par FISH, ne permet pas de rendre compte de l'activation de MET par d'autres mécanismes, comme par exemple une surexpression de l'HGF/SF. Ainsi, d'autres biomarqueurs sont proposés et parmi ceux-ci se trouve la forme active du récepteur MET. En effet, la phosphorylation de MET notamment dans son domaine kinase, reflète mieux l'activation du récepteur. D'ailleurs, plusieurs anticorps spécifiques reconnaissant la forme phosphorylée de MET peuvent être utilisés par IHC. Néanmoins, la faible stabilité de ces sites de phosphorylation *ex vivo* pourrait nécessiter une attention particulière pour une utilisation en routine, en clinique (Furlan et al 2014, Garber 2014). Par ailleurs, et au vu de nos résultats, l'utilisation de la phosphorylation de MET comme biomarqueur pourrait poser d'autres inconvénients. En effet, puisque MET subit une forte baisse de sa phosphorylation en hypoxie et que des zones hypoxiques sont présentes dans la majorité des tumeurs solides, l'utilisation de la forme phosphorylée de MET comme marqueur pronostic ou diagnostique pourrait mener à des erreurs d'interprétation et l'inclusion de faux négatifs.

Dans leur ensemble, nos données permettent d'avoir un nouveau regard sur la régulation de l'activité des oncogènes en hypoxie. Les conséquences de ces régulations sont importantes pour le développement des nouveaux traitements avec la promesse d'une amélioration possible des thérapies ciblées utilisées dans le cancer en évitent notamment les phénomènes de résistances.

Références bibliographiques :

Abboud-Jarrous G, Atzmon R, Peretz T, Palermo C, Gadea BB, Joyce JA *et al* (2008). Cathepsin L is responsible for processing and activation of proheparanase through multiple cleavages of a linker segment. *The Journal of biological chemistry* **283**: 18167-18176.

Abdel-Rahman O (2015). Targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway in gastric cancer: preclinical and clinical aspects. *Critical reviews in oncology/hematology* **93**: 18-27.

Abella JV, Peschard P, Naujokas MA, Lin T, Saucier C, Urbe S *et al* (2005). Met/Hepatocyte growth factor receptor ubiquitination suppresses transformation and is required for Hrs phosphorylation. *Molecular and cellular biology* **25**: 9632-9645.

Abounader R, Laterra J (2005). Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumor growth and angiogenesis. *Neuro-oncology* **7**: 436-451.

Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH *et al* (2001). Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer research* **61**: 2911-2916.

Ahmadzadeh V, Farajnia S, Feizi MA, Nejad RA (2014). Antibody humanization methods for development of therapeutic applications. *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy* **33**: 67-73.

Alonzi R (2015). Functional Radiotherapy Targeting using Focused Dose Escalation. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **27**: 601-617.

Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ *et al* (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**: 1626-1634.

Amemiya H, Kono K, Itakura J, Tang RF, Takahashi A, An FQ *et al* (2002). c-Met expression in gastric cancer with liver metastasis. *Oncology* **63**: 286-296.

Ancot F, Leroy C, Muharram G, Lefebvre J, Vicogne J, Lemiere A *et al* (2012). Shedding-generated Met receptor fragments can be routed to either the proteasomal or the lysosomal degradation pathway. *Traffic* **13**: 1261-1272.

Andermarcher E, Surani MA, 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. *Developmental genetics* **18**: 254-266.

Asaoka Y, Tada M, Ikenoue T, Seto M, Imai M, Miyabayashi K *et al* (2010). Gastric cancer cell line Hs746T harbors a splice site mutation of c-Met causing juxtamembrane domain deletion. *Biochemical and biophysical research communications* **394**: 1042-1046.

Bachleitner-Hofmann T, Sun MY, Chen CT, Tang L, Song L, Zeng Z *et al* (2008). HER kinase activation confers resistance to MET tyrosine kinase inhibition in MET oncogene-addicted gastric cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* **7**: 3499-3508.

Bardelli A, Longati P, Gramaglia D, Stella MC, Comoglio PM (1997). Gab1 coupling to the HGF/Met receptor multifunctional docking site requires binding of Grb2 and correlates with the transforming potential. *Oncogene* **15**: 3103-3111.

Bardelli A, Corso S, Bertotti A, Hobor S, Valtorta E, Siravegna G *et al* (2013). Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer discovery* **3**: 658-673.

Barrow-McGee R, Kermorgant S (2014). Met endosomal signalling: in the right place, at the right time. *The international journal of biochemistry & cell biology* **49**: 69-74.

Basilico C, Arnesano A, Galluzzo M, Comoglio PM, Michieli P (2008). A high affinity hepatocyte growth factor-binding site in the immunoglobulin-like region of Met. *The Journal of biological chemistry* **283**: 21267-21277.

Basilico C, Pennacchietti S, Vigna E, Chiriaco C, Arena S, Bardelli A *et al* (2013). Tivantinib (ARQ197) displays cytotoxic activity that is independent of its ability to bind MET. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**: 2381-2392.

Bean J, Brennan C, Shih JY, Riely G, Viale A, Wang L *et al* (2007). MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 20932-20937.

Beasley NJ, Leek R, Alam M, Turley H, Cox GJ, Gatter K *et al* (2002). Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer research* **62**: 2493-2497.

Behrendt N (2004). The urokinase receptor (uPAR) and the uPAR-associated protein (uPARAP/Endo180): membrane proteins engaged in matrix turnover during tissue remodeling. *Biological chemistry* **385**: 103-136.

Benarafa C (2015). Tumor-induced inflammation alters neutrophil phenotype and disease progression. *Breast cancer research : BCR* **17**: 135.

Bentzen SM, Gregoire V (2011). Molecular imaging-based dose painting: a novel paradigm for radiation therapy prescription. *Seminars in radiation oncology* **21**: 101-110.

Benvenuti S, Comoglio PM (2007). The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. *Journal of cellular physiology* **213**: 316-325.

Berra E, Richard DE, Gothie E, Pouyssegur J (2001). HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation. *FEBS letters* **491**: 85-90.

Bertotti A, Comoglio PM, Trusolino L (2006). Beta4 integrin activates a Shp2-Src signaling pathway that sustains HGF-induced anchorage-independent growth. *The Journal of cell biology* **175**: 993-1003.

Bertotti A, Burbridge MF, Gastaldi S, Galimi F, Torti D, Medico E *et al* (2009). Only a subset of Met-activated pathways are required to sustain oncogene addiction. *Science signaling* **2**: ra80.

Bertout JA, Patel SA, Simon MC (2008). The impact of O₂ availability on human cancer. *Nature reviews Cancer* **8**: 967-975.

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* **432**: 332-337.

Birchmeier C, Gherardi E (1998). Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends in cell biology* **8**: 404-410.

Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nature reviews Molecular cell biology* **4**: 915-925.

Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G (2000). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer research* **60**: 4693-4696.

Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenecker G, Oberhuber G (2001). Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **7**: 1661-1668.

Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, 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.

Blick C, Ramachandran A, Wigfield S, McCormick R, Jubb A, Buffa FM *et al* (2013). Hypoxia regulates FGFR3 expression via HIF-1 α and miR-100 and contributes to cell survival in non-muscle invasive bladder cancer. *British journal of cancer* **109**: 50-59.

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

Boccaccio C, Ando M, Tamagnone L, Bardelli A, Michieli P, Battistini C *et al* (1998). Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* **391**: 285-288.

Boccaccio C, Comoglio PM (2006). Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nature reviews Cancer* **6**: 637-645.

Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF *et al* (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* **251**: 802-804.

Brader S, Eccles SA (2004). Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in tumor progression, invasion and angiogenesis. *Tumori* **90**: 2-8.

Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J (2007). Harnessing the hypoxia-inducible factor in cancer and ischemic disease. *Biochemical pharmacology* **73**: 450-457.

Brahimi-Horn MC, Bellot G, Pouyssegur J (2011). Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Current opinion in genetics & development* **21**: 67-72.

Bremnes RM, Donnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Andersen S, Sirera R *et al* (2011). The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **6**: 209-217.

Brinkmann V, Foroutan H, Sachs M, Weidner KM, Birchmeier W (1995). Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells. *The Journal of cell biology* **131**: 1573-1586.

Brown JM (1999). The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy--eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. *Cancer research* **59**: 5863-5870.

Brown JM (2007). Tumor hypoxia in cancer therapy. *Methods in enzymology* **435**: 297-321.

Brummer T, Schmitz-Peiffer C, Daly RJ (2010). Docking proteins. *The FEBS journal* **277**: 4356-4369.

Buchanan IM, Scott T, Tandle AT, Burgan WE, Burgess TL, Tofilon PJ *et al* (2011). Radiosensitization of glioma cells by modulation of Met signalling with the hepatocyte growth factor neutralizing antibody, AMG102. *Journal of cellular and molecular medicine* **15**: 1999-2006.

Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L *et al* (1992). Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *The Journal of cell biology* **119**: 629-641.

Cairns RA, Kalliomaki T, Hill RP (2001). Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of KHT murine tumors. *Cancer research* **61**: 8903-8908.

Calvi C, Podowski M, Lopez-Mercado A, Metzger S, Misono K, Malinina A *et al* (2013). Hepatocyte growth factor, a determinant of airspace homeostasis in the murine lung. *PLoS genetics* **9**: e1003228.

Campbell DB, Sutcliffe JS, Ebert PJ, Militerni R, Bravaccio C, Trillo S *et al* (2006). A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 16834-16839.

Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* **511**: 543-550.

Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ (2005). The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nature reviews Cancer* **5**: 786-795.

Cepero V, Sierra JR, Corso S, Ghiso E, Casorzo L, Perera T *et al* (2010). MET and KRAS gene amplification mediates acquired resistance to MET tyrosine kinase inhibitors. *Cancer research* **70**: 7580-7590.

Chambard JC, Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochimica et biophysica acta* **1773**: 1299-1310.

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

Chen SY, Chen HC (2006). Direct interaction of focal adhesion kinase (FAK) with Met is required for FAK to promote hepatocyte growth factor-induced cell invasion. *Molecular and cellular biology* **26**: 5155-5167.

Chen Y-fL-wF (2011). Mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **1**: 197-207.

Chiara F, Michieli P, Pugliese L, Comoglio PM (2003). Mutations in the met oncogene unveil a "dual switch" mechanism controlling tyrosine kinase activity. *The Journal of biological chemistry* **278**: 29352-29358.

Chiche J, Ilc K, Laferriere J, Trottier E, Dayan F, Mazure NM *et al* (2009). Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer research* **69**: 358-368.

Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J (2010a). Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *Journal of cellular and molecular medicine* **14**: 771-794.

Chiche J, Ilc K, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J (2010b). Membrane-bound carbonic anhydrases are key pH regulators controlling tumor growth and cell migration. *Adv Enzyme Regul* **50**: 20-33.

Chirgadze DY, Hepple JP, Zhou H, Byrd RA, Blundell TL, Gherardi E (1999). Crystal structure of the NK1 fragment of HGF/SF suggests a novel mode for growth factor dimerization and receptor binding. *Nat Struct Biol* **6**: 72-79.

Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, Stradal T, Munz B, Werner S *et al* (2007). c-Met is essential for wound healing in the skin. *The Journal of cell biology* **177**: 151-162.

Christensen JG, Schreck R, Burrows J, Kuruganti P, Chan E, Le P *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 research* **63**: 7345-7355.

Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Pomatico G, Pepe S *et al* (1998). Cooperative inhibition of renal cancer growth by anti-epidermal growth factor receptor antibody and protein kinase A antisense oligonucleotide. *Journal of the National Cancer Institute* **90**: 1087-1094.

Cohen I, Pappo O, Elkin M, San T, Bar-Shavit R, Hazan R *et al* (2006). Heparanase promotes growth, angiogenesis and survival of primary breast tumors. *International journal of cancer Journal international du cancer* **118**: 1609-1617.

Coltella N, Rasola A, Nano E, Bardella C, Fassetta M, Filigheddu N *et al* (2006). p38 MAPK turns hepatocyte growth factor to a death signal that commits ovarian cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. *International journal of cancer Journal international du cancer* **118**: 2981-2990.

Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP (2002). Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer research* **62**: 3387-3394.

Comoglio PM, Boccaccio C, Trusolino L (2003). Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Current opinion in cell biology* **15**: 565-571.

Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L (2008). Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nature reviews Drug discovery* **7**: 504-516.

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

Conrotto P, Valdembri D, Corso S, Serini G, Tamagnone L, Comoglio PM *et al* (2005). Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1. *Blood* **105**: 4321-4329.

Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM *et al* (1984). Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* **311**: 29-33.

Corso S, 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 discovery* **3**: 978-992.

Cortesina G, Martone T, Galeazzi E, Olivero M, De Stefani A, Bussi M *et al* (2000). Staging of head and neck squamous cell carcinoma using the MET oncogene product as marker of tumor cells in lymph node metastases. *International journal of cancer Journal international du cancer* **89**: 286-292.

Coxon A, Rex K, Meyer S, Sun J, Sun J, Chen Q *et al* (2009). 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* **8**: 1119-1125.

Cristiani C, Rusconi L, Perego R, Schiering N, Kalisz HM, Knapp S *et al* (2005). Regulation of the wild-type and Y1235D mutant Met kinase activation. *Biochemistry* **44**: 14110-14119.

Date K, Matsumoto K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T (1997). HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor. *FEBS letters* **420**: 1-6.

den Hertog J, Ostman A, Bohmer FD (2008). Protein tyrosine phosphatases: regulatory mechanisms. *The FEBS journal* **275**: 831-847.

Denu JM, Tanner KG (1998). Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* **37**: 5633-5642.

Dery MA, Michaud MD, Richard DE (2005). Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *The international journal of biochemistry & cell biology* **37**: 535-540.

Di Renzo MF, Olivero M, Martone T, Maffe A, Maggiora P, Stefani AD *et al* (2000). Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. *Oncogene* **19**: 1547-1555.

Doktorova H, Hrabeta J, Khalil MA, Eckschlager T (2015). Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: The role of not only HIF-1. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* **159**: 166-177.

Donev IS, Wang W, Yamada T, Li Q, Takeuchi S, Matsumoto K *et al* (2011). Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**: 2260-2269.

Duan HF, Qu CK, Zhang QW, Yu WM, Wang H, Wu CT *et al* (2006). Shp-2 tyrosine phosphatase is required for hepatocyte growth factor-induced activation of sphingosine kinase and migration in embryonic fibroblasts. *Cellular signalling* **18**: 2049-2055.

Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM (1999). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Current topics in microbiology and immunology* **237**: 97-132.

Eathiraj S, Palma R, Volckova E, Hirschi M, France DS, Ashwell MA *et al* (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. *The Journal of biological chemistry* **286**: 20666-20676.

Eckerich C, Zapf S, Fillbrandt R, Loges S, Westphal M, Lamszus K (2007). Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGF-induced cell migration. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* **121**: 276-283.

Elimova E, Wadhwa R, Shiozaki H, Sudo K, Estrella JS, Badgwell BD *et al* (2015). Molecular biomarkers in gastric cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* **13**: e19-29.

Elkin M, Ilan N, Ishai-Michaeli R, Friedmann Y, Papo O, Pecker I *et al* (2001). Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15**: 1661-1663.

Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO *et al* (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* **316**: 1039-1043.

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR *et al* (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**: 43-54.

Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhofer N, Kong C, Le QT *et al* (2006). Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* **440**: 1222-1226.

Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M *et al* (2007). Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine* **356**: 125-134.

Esko JD, Selleck SB (2002). Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem* **71**: 435-471.

Esposito C, Parrilla B, De Mauri A, Cornacchia F, Fasoli G, Foschi A *et al* (2005). Hepatocyte growth factor (HGF) modulates matrix turnover in human glomeruli. *Kidney international* **67**: 2143-2150.

Ferracini R, Di Renzo MF, Scotlandi K, Baldini N, Olivero M, Lollini P *et al* (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.

Ferrara N, Davis-Smyth T (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews* **18**: 4-25.

Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature reviews Drug discovery* **3**: 391-400.

Finisguerra V, Di Conza G, Di Matteo M, Serneels J, Costa S, Thompson AA *et al* (2015). MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils. *Nature* **522**: 349-353.

Fixman ED, Fournier TM, Kamikura DM, Naujokas MA, Park M (1996). Pathways downstream of Shc and Grb2 are required for cell transformation by the tpr-Met oncoprotein. *The Journal of biological chemistry* **271**: 13116-13122.

Fixman ED, Holgado-Madruga M, Nguyen L, Kamikura DM, Fournier TM, Wong AJ *et al* (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. *The Journal of biological chemistry* **272**: 20167-20172.

Flint AJ, Tiganis T, Barford D, Tonks NK (1997). Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 1680-1685.

Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I (1988). A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane. *The American journal of pathology* **130**: 393-400.

Follenzi A, Bakovic S, Gual P, Stella MC, Longati P, Comoglio PM (2000). Cross-talk between the proto-oncogenes Met and Ron. *Oncogene* **19**: 3041-3049.

Foveau B, Leroy C, Ancot F, Deheuninck J, Ji Z, Fafeur V *et al* (2007). Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor. *Cell death and differentiation* **14**: 752-764.

Foveau B, Ancot F, Leroy C, Petrelli A, Reiss K, Vingtdeux V *et al* (2009). Down-regulation of the met receptor tyrosine kinase by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis. *Molecular biology of the cell* **20**: 2495-2507.

Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, Chmielecki J, Lu X, Bauer TM *et al* (2015). Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer discovery*.

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

Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF (2000). Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* **19**: 5582-5589.

Furlan A, Kherrouche Z, Montagne R, Copin MC, Tulasne D (2014). Thirty years of research on met receptor to move a biomarker from bench to bedside. *Cancer research* **74**: 6737-6744.

Gak E, Taylor WG, Chan AM, Rubin JS (1992). Processing of hepatocyte growth factor to the heterodimeric form is required for biological activity. *FEBS letters* **311**: 17-21.

Gallego MI, Bieri B, 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 JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV *et al* (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation* **19**: 107-120.

Gambarotta G, Boccaccio C, Giordano S, Ando M, Stella MC, Comoglio PM (1996). Ets up-regulates MET transcription. *Oncogene* **13**: 1911-1917.

Gandino L, Longati P, Medico E, Prat M, Comoglio PM (1994). Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *The Journal of biological chemistry* **269**: 1815-1820.

Garber K (2014). MET inhibitors start on road to recovery. *Nature reviews Drug discovery* **13**: 563-565.

Garcia S, Dales JP, Charafe-Jauffret E, Carpentier-Meunier S, Andrac-Meyer L, Jacquemier J *et al* (2007). Poor prognosis in breast carcinomas correlates with increased expression of targetable CD146 and c-Met and with proteomic basal-like phenotype. *Human pathology* **38**: 830-841.

Garcia-Guzman M, Dolfi F, Zeh K, 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.

Gatenby RA, Gillies RJ (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature reviews Cancer* **4**: 891-899.

Gherardi E, Youles ME, Miguel RN, Blundell TL, Iamele L, Gough J *et al* (2003). 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* **100**: 12039-12044.

Gherardi E, Love CA, Esnouf RM, Jones EY (2004). The sema domain. *Current opinion in structural biology* **14**: 669-678.

Gherardi E, Sandin S, Petoukhov MV, Finch J, Youles ME, Ofverstedt LG *et al* (2006). Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 4046-4051.

Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Vande Woude G (2012). Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nature reviews Cancer* **12**: 89-103.

Ghousoub RA, Dillon DA, D'Aquila T, Rimm EB, Fearon ER, Rimm DL (1998). Expression of c-met is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma. *Cancer* **82**: 1513-1520.

Giaccia A, Siim BG, Johnson RS (2003). HIF-1 as a target for drug development. *Nature reviews Drug discovery* **2**: 803-811.

Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F *et al* (2001). Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *British journal of cancer* **85**: 881-890.

Giordano S, Corso S, Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D *et al* (2002). The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nature cell biology* **4**: 720-724.

Giusti I, D'Ascenzo S, Millimaggi D, Taraboletti G, Carta G, Franceschini N *et al* (2008). Cathepsin B mediates the pH-dependent proinvasive activity of tumor-shed microvesicles. *Neoplasia* **10**: 481-488.

Gluck AA, Aebersold DM, Zimmer Y, Medova M (2015). Interplay between receptor tyrosine kinases and hypoxia signaling in cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology* **62**: 101-114.

Glunde K, Guggino SE, Solaiyappan M, Pathak AP, Ichikawa Y, Bhujwalla ZM (2003). Extracellular acidification alters lysosomal trafficking in human breast cancer cells. *Neoplasia* **5**: 533-545.

Goldoni S, Humphries A, Nystrom A, Sattar S, Owens RT, McQuillan DJ *et al* (2009). Decorin is a novel antagonistic ligand of the Met receptor. *The Journal of cell biology* **185**: 743-754.

Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC (2007). HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer cell* **11**: 335-347.

Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW *et al* (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* **379**: 88-91.

Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG (2000). Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *The Journal of biological chemistry* **275**: 2727-2732.

Graham CH, Fitzpatrick TE, McCrae KR (1998). Hypoxia stimulates urokinase receptor expression through a heme protein-dependent pathway. *Blood* **91**: 3300-3307.

Graham CH, Forsdike J, Fitzgerald CJ, Macdonald-Goodfellow S (1999). Hypoxia-mediated stimulation of carcinoma cell invasiveness via upregulation of urokinase receptor expression. *International journal of cancer Journal international du cancer* **80**: 617-623.

Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL *et al* (1993). Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 1937-1941.

Graveel C, Su Y, Koeman J, Wang LM, Tessarollo L, Fiscella M *et al* (2004). Activating Met mutations produce unique tumor profiles in mice with selective duplication of the mutant allele. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 17198-17203.

Graveel CR, DeGroot JD, Su Y, Koeman J, Dykema K, Leung S *et al* (2009). Met induces diverse mammary carcinomas in mice and is associated with human basal breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 12909-12914.

Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC (1953). The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *The British journal of radiology* **26**: 638-648.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**: 883-899.

Gu YF, Zhang H, Su D, Mo ML, Song P, Zhang F *et al* (2013). miR-30b and miR-30c expression predicted response to tyrosine kinase inhibitors as first line treatment in non-small cell lung cancer. *Chinese medical journal* **126**: 4435-4439.

Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene expression* **7**: 205-213.

Gual P, Giordano S, Williams TA, Rocchi S, Van Obberghen E, Comoglio PM (2000). Sustained recruitment of phospholipase C-gamma to Gab1 is required for HGF-induced branching tubulogenesis. *Oncogene* **19**: 1509-1518.

Gunaratnam L, Morley M, Franovic A, de Paulsen N, Mekhail K, Parolin DA *et al* (2003). Hypoxia inducible factor activates the transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathway in VHL(-/-) renal cell carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* **278**: 44966-44974.

Guo A, Villen J, Kornhauser J, Lee KA, Stokes MP, Rikova K *et al* (2008). Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 692-697.

Gut MO, Parkkila S, Vernerova Z, Rohde E, Zavada J, Hocker M *et al* (2002). Gastric hyperplasia in mice with targeted disruption of the carbonic anhydrase gene Car9. *Gastroenterology* **123**: 1889-1903.

Haj FG, Markova B, Klamann LD, Bohmer FD, Neel BG (2003). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *The Journal of biological chemistry* **278**: 739-744.

Hammond DE, Urbe S, Vande Woude GF, Clague MJ (2001). Down-regulation of MET, the receptor for hepatocyte growth factor. *Oncogene* **20**: 2761-2770.

Han JY, Kim JY, Lee SH, Yoo NJ, Choi BG (2011). Association between plasma hepatocyte growth factor and gefitinib resistance in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **74**: 293-299.

Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674.

Harris AL (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews Cancer* **2**: 38-47.

Hartmann G, Prospero T, Brinkmann V, Ozcelik C, Winter G, Hepple J *et al* (1998). Engineered mutants of HGF/SF with reduced binding to heparan sulphate proteoglycans, decreased clearance and enhanced activity in vivo. *Curr Biol* **8**: 125-134.

Hashigasako A, Machide M, Nakamura T, Matsumoto K, 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. *The Journal of biological chemistry* **279**: 26445-26452.

Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Tahara M, Yamamoto T, Okamoto Y *et al* (2005). Up-regulation of c-met protooncogene product expression through hypoxia-inducible factor-1alpha is involved in trophoblast invasion under low-oxygen tension. *Endocrinology* **146**: 4682-4689.

Herrick J, Michalet X, Conti C, Schurra C, Bensimon A (2000). Quantifying single gene copy number by measuring fluorescent probe lengths on combed genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 222-227.

Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW *et al* (2002). Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *The Journal of biological chemistry* **277**: 26351-26355.

Hiraga T, Kizaka-Kondoh S, Hirota K, Hiraoka M, Yoneda T (2007). Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer. *Cancer research* **67**: 4157-4163.

Hiscox S, Jiang WG (1999). Association of the HGF/SF receptor, c-met, with the cell-surface adhesion molecule, E-cadherin, and catenins in human tumor cells. *Biochemical and biophysical research communications* **261**: 406-411.

Hoenig MR, Bianchi C, Sellke FW (2008). Hypoxia inducible factor-1 alpha, endothelial progenitor cells, monocytes, cardiovascular risk, wound healing, cobalt and hydralazine: a unifying hypothesis. *Current drug targets* **9**: 422-435.

Holmes O, Pillozzi S, Deakin JA, Carafoli F, Kemp L, Butler PJ *et al* (2007). Insights into the structure/function of hepatocyte growth factor/scatter factor from studies with individual domains. *Journal of molecular biology* **367**: 395-408.

Hong SY, Shih YP, Li T, Carraway KL, 3rd, Lo SH (2013). CTEN prolongs signaling by EGFR through reducing its ligand-induced degradation. *Cancer research* **73**: 5266-5276.

Hu N, Mei M, Ruan J, Wu W, Wang Y, Yan R (2013). Regioselective Glucuronidation of Oxyresveratrol, a Natural Hydroxystilbene, by Human Liver and Intestinal Microsomes and Recombinant UGTs. *Drug metabolism and pharmacokinetics*.

Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 7987-7992.

Huang PH, Mukasa A, Bonavia R, Flynn RA, Brewer ZE, Cavenee WK *et al* (2007). Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 12867-12872.

Hubbi ME, Kshitiz, Gilkes DM, Rey S, Wong CC, Luo W *et al* (2013). A nontranscriptional role for HIF-1alpha as a direct inhibitor of DNA replication. *Science signaling* **6**: ra10.

Hubbi ME, Semenza GL (2015). Regulation of Cell Proliferation by Hypoxia-Inducible Factors. *American journal of physiology Cell physiology*: ajpcell 00279 02015.

Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS (2004). Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 4477-4482.

Humphrey PA, Halabi S, Picus J, Sanford B, Vogelzang NJ, Small EJ *et al* (2006). Prognostic significance of plasma scatter factor/hepatocyte growth factor levels in patients with metastatic hormone- refractory prostate cancer: results from cancer and leukemia group B 150005/9480. *Clinical genitourinary cancer* **4**: 269-274.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W *et al* (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* **350**: 2335-2342.

Ide T, Kitajima Y, Miyoshi A, Ohtsuka T, Mitsuno M, Ohtaka K *et al* (2006). Tumor-stromal cell interaction under hypoxia increases the invasiveness of pancreatic cancer cells through the hepatocyte growth factor/c-Met pathway. *International journal of cancer Journal international du cancer* **119**: 2750-2759.

Ilan N, Elkin M, Vlodaysky I (2006). Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology* **38**: 2018-2039.

Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG, Jr. (1995). Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nature medicine* **1**: 822-826.

Imai T, Horiuchi A, Wang C, Oka K, Ohira S, Nikaido T *et al* (2003). Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *The American journal of pathology* **163**: 1437-1447.

Ishibe S, Karihaloo A, Ma H, Zhang J, Marlier A, Mitobe M *et al* (2009). Met and the epidermal growth factor receptor act cooperatively to regulate final nephron number and maintain collecting duct morphology. *Development* **136**: 337-345.

Ivan M, Bond JA, Prat M, Comoglio PM, 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.

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M *et al* (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**: 464-468.

Iveson T, Donehower RC, Davidenko I, Tjulandin S, Deptala A, Harrison M *et al* (2014). Rilotumumab in combination with epirubicin, cisplatin, and capecitabine as first-line treatment for gastric or oesophagogastric junction adenocarcinoma: an open-label, dose de-escalation phase 1b study and a double-blind, randomised phase 2 study. *The Lancet Oncology* **15**: 1007-1018.

Iwai Y, Terawaki S, Honjo T (2005). PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *International immunology* **17**: 133-144.

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ *et al* (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**: 468-472.

Jagadeeswaran R, Ma PC, Seiwert TY, Jagadeeswaran S, Zumba O, Nallasura V *et al* (2006). Functional analysis of c-Met/hepatocyte growth factor pathway in malignant pleural mesothelioma. *Cancer research* **66**: 352-361.

Jain S, Maltepe E, Lu MM, Simon C, Bradfield CA (1998). Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 α , HIF2 α and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mechanisms of development* **73**: 117-123.

Jardim DL, Tang C, Gagliato Dde M, Falchook GS, Hess K, Janku F *et al* (2014). Analysis of 1,115 patients tested for MET amplification and therapy response in the MD Anderson Phase I Clinic. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**: 6336-6345.

- Jeffers M, Schmidt L, Nakaigawa N, Webb CP, Weirich G, Kishida T *et al* (1997). Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 11445-11450.
- Jeffers M, Fiscella M, Webb CP, Anver M, Koochekpour S, Vande Woude GF (1998). The mutationally activated Met receptor mediates motility and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 14417-14422.
- Jeffers MF, Vande Woude GF (1999). Activating mutations in the Met receptor overcome the requirement for autophosphorylation of tyrosines crucial for wild type signaling. *Oncogene* **18**: 5120-5125.
- Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *The American journal of physiology* **271**: C1172-1180.
- Jiang BH, Agani F, Passaniti A, Semenza GL (1997). V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer research* **57**: 5328-5335.
- Jiang W, Hiscox S, Matsumoto K, Nakamura T (1999). Hepatocyte growth factor/scatter factor, its molecular, cellular and clinical implications in cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* **29**: 209-248.
- Jin H, Yang R, Li W, Ogasawara AK, Schwall R, Eberhard DA *et al* (2003). Early treatment with hepatocyte growth factor improves cardiac function in experimental heart failure induced by myocardial infarction. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **304**: 654-660.
- Jo M, Stolz DB, Esplen JE, Dorko K, Michalopoulos GK, Strom SC (2000). Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *The Journal of biological chemistry* **275**: 8806-8811.
- Joffre C, Barrow R, Menard L, Calleja V, Hart IR, Kermorgant S (2011). A direct role for Met endocytosis in tumorigenesis. *Nature cell biology* **13**: 827-837.
- Johnson TW, Richardson PF, Bailey S, Brooun A, Burke BJ, Collins MR *et al* (2014). Discovery of (10R)-7-amino-12-fluoro-2,10,16-trimethyl-15-oxo-10,15,16,17-tetrahydro-2H-8,4-(m etheno)pyrazolo[4,3-h][2,5,11]-benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile (PF-06463922), a macrocyclic inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and c-ros oncogene 1 (ROS1) with preclinical brain exposure and broad-spectrum potency against ALK-resistant mutations. *Journal of medicinal chemistry* **57**: 4720-4744.
- Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H *et al* (1998). Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *The EMBO journal* **17**: 6573-6586.

Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L (1999). Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *The Journal of biological chemistry* **274**: 6519-6525.

Kamei T, Matozaki T, Sakisaka T, Kodama A, Yokoyama S, Peng YF *et al* (1999). Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells--regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins. *Oncogene* **18**: 6776-6784.

Karakashev SV, Reginato MJ (2015). Hypoxia/HIF1alpha induces lapatinib resistance in ERBB2-positive breast cancer cells via regulation of DUSP2. *Oncotarget* **6**: 1967-1980.

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC *et al* (2008). K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England journal of medicine* **359**: 1757-1765.

Katayama R, Aoyama A, Yamori T, Qi J, Oh-hara T, Song Y *et al* (2013). Cytotoxic activity of tivantinib (ARQ 197) is not due solely to c-MET inhibition. *Cancer research* **73**: 3087-3096.

Kawaida K, Matsumoto K, Shimazu H, Nakamura T (1994). Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 4357-4361.

Kawakami H, Okamoto I, Okamoto W, Tanizaki J, Nakagawa K, Nishio K (2014). Targeting MET Amplification as a New Oncogenic Driver. *Cancers* **6**: 1540-1552.

Kemp LE, Mulloy B, Gherardi E (2006). Signalling by HGF/SF and Met: the role of heparan sulphate co-receptors. *Biochemical Society transactions* **34**: 414-417.

Kermorgant S, Zicha D, Parker PJ (2003). Protein kinase C controls microtubule-based traffic but not proteasomal degradation of c-Met. *The Journal of biological chemistry* **278**: 28921-28929.

Kermorgant S, Zicha D, Parker PJ (2004). PKC controls HGF-dependent c-Met traffic, signalling and cell migration. *The EMBO journal* **23**: 3721-3734.

Kermorgant S, Parker PJ (2005). c-Met signalling: spatio-temporal decisions. *Cell Cycle* **4**: 352-355.

Kim KW, Bae SK, Lee OH, Bae MH, Lee MJ, Park BC (1998). Insulin-like growth factor II induced by hypoxia may contribute to angiogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Cancer research* **58**: 348-351.

Kim WH, Matsumoto K, Bessho K, Nakamura T (2005). Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis. *The American journal of pathology* **166**: 1017-1028.

Knowles HJ, Tian YM, Mole DR, Harris AL (2004). Novel mechanism of action for hydralazine: induction of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth

factor, and angiogenesis by inhibition of prolyl hydroxylases. *Circulation research* **95**: 162-169.

Komada M, Hatsuzawa K, Shibamoto S, Ito F, Nakayama K, Kitamura N (1993). Proteolytic processing of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor by furin. *FEBS letters* **328**: 25-29.

Komada M, Kitamura N (1995). Growth factor-induced tyrosine phosphorylation of Hrs, a novel 115-kilodalton protein with a structurally conserved putative zinc finger domain. *Molecular and cellular biology* **15**: 6213-6221.

Komarowska I, Coe D, Wang G, Haas R, Mauro C, Kishore M *et al* (2015). Hepatocyte Growth Factor Receptor c-Met Instructs T Cell Cardiotropism and Promotes T Cell Migration to the Heart via Autocrine Chemokine Release. *Immunity* **42**: 1087-1099.

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

Kong-Beltran M, Seshagiri S, Zha J, Zhu W, Bhawe K, Mendoza N *et al* (2006). Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer research* **66**: 283-289.

Korhan P, Erdal E, Atabey N (2014). MiR-181a-5p is downregulated in hepatocellular carcinoma and suppresses motility, invasion and branching-morphogenesis by directly targeting c-Met. *Biochemical and biophysical research communications* **450**: 1304-1312.

Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, Huang LE (2004). HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *The EMBO journal* **23**: 1949-1956.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Turley H, Talks K *et al* (2002). Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **53**: 1192-1202.

Krause DS, Van Etten RA (2005). Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *The New England journal of medicine* **353**: 172-187.

Krishnamachary B, Zagzag D, Nagasawa H, Rainey K, Okuyama H, Baek JH *et al* (2006). Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B. *Cancer research* **66**: 2725-2731.

Kung AL, Wang S, Klco JM, Kaelin WG, Livingston DM (2000). Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nature medicine* **6**: 1335-1340.

- Kung AL, Zabludoff SD, France DS, Freedman SJ, Tanner EA, Vieira A *et al* (2004). Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway. *Cancer cell* **6**: 33-43.
- Lai AZ, Abella JV, Park M (2009). Crosstalk in Met receptor oncogenesis. *Trends in cell biology* **19**: 542-551.
- Lamballe F, Genestine M, Caruso N, Arce V, Richelme S, Helmbacher F *et al* (2011). Pool-specific regulation of motor neuron survival by neurotrophic support. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**: 11144-11158.
- Lan F, Yu H, Hu M, Xia T, Yue X (2015). miR-144-3p exerts anti-tumor effects in glioblastoma by targeting c-Met. *Journal of neurochemistry*.
- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK (2002a). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & development* **16**: 1466-1471.
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML (2002b). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* **295**: 858-861.
- Lantuejoul S, Rouquette I, Blons H, Le Stang N, Ilie M, Begueret H *et al* (2015). French multicentric validation of ALK rearrangement diagnostic in 547 lung adenocarcinomas. *The European respiratory journal* **46**: 207-218.
- Lee J, Ou SH, Lee JM, Kim HC, Hong M, Kim SY *et al* (2015). Gastrointestinal malignancies harbor actionable MET exon 14 deletions. *Oncotarget* **6**: 28211-28222.
- Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG (1998). Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *The Journal of biological chemistry* **273**: 15366-15372.
- Lee WY, Chen HH, Chow NH, Su WC, Lin PW, Guo HR (2005). Prognostic significance of co-expression of RON and MET receptors in node-negative breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**: 2222-2228.
- Lee YH, Morrison BL, Bottaro DP (2014). Synergistic signaling of tumor cell invasiveness by hepatocyte growth factor and hypoxia. *The Journal of biological chemistry* **289**: 20448-20461.
- Lefebvre J, Ancot F, Leroy C, Muharram G, Lemiere A, Tulasne D (2012). Met degradation: more than one stone to shoot a receptor down. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**: 1387-1399.
- Lefebvre J, Muharram G, Leroy C, Kherrouche Z, Montagne R, Ichim G *et al* (2013). Caspase-generated fragment of the Met receptor favors apoptosis via the intrinsic pathway independently of its tyrosine kinase activity. *Cell death & disease* **4**: e871.

Lemmon MA, Schlessinger J (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**: 1117-1134.

Lennerz JK, Kwak EL, Ackerman A, Michael M, Fox SB, Bergethon K *et al* (2011). MET amplification identifies a small and aggressive subgroup of esophagogastric adenocarcinoma with evidence of responsiveness to crizotinib. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**: 4803-4810.

Leppilampi M, Karttunen TJ, Kivela J, Gut MO, Pastorekova S, Pastorek J *et al* (2005). Gastric pit cell hyperplasia and glandular atrophy in carbonic anhydrase IX knockout mice: studies on two strains C57/BL6 and BALB/C. *Transgenic research* **14**: 655-663.

Levy DE, Darnell JE, Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews Molecular cell biology* **3**: 651-662.

Levy-Adam F, Miao HQ, Henrikson RL, Vlodavsky I, Ilan N (2003). Heterodimer formation is essential for heparanase enzymatic activity. *Biochemical and biophysical research communications* **308**: 885-891.

Levy-Adam F, Feld S, Cohen-Kaplan V, Shteingauz A, Gross M, Arvatz G *et al* (2010). Heparanase 2 interacts with heparan sulfate with high affinity and inhibits heparanase activity. *The Journal of biological chemistry* **285**: 28010-28019.

Li N, Batzer A, Daly R, Yajnik V, Skolnik E, Chardin P *et al* (1993). Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* **363**: 85-88.

Liao D, Corle C, Seagroves TN, Johnson RS (2007). Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer research* **67**: 563-572.

Lietha D, Chirgadze DY, Mulloy B, Blundell TL, Gherardi E (2001). Crystal structures of NK1-heparin complexes reveal the basis for NK1 activity and enable engineering of potent agonists of the MET receptor. *The EMBO journal* **20**: 5543-5555.

Lin JC, Naujokas M, Zhu H, Nolet S, 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.

Liu X, Jia Y, Stoopler MB, Shen Y, Cheng H, Chen J *et al* (2015). Next-Generation Sequencing of Pulmonary Sarcomatoid Carcinoma Reveals High Frequency of Actionable MET Gene Mutations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*.

Liu Y, Zhang Q, Ren C, Ding Y, Jin G, Hu Z *et al* (2012). A germline variant N375S in MET and gastric cancer susceptibility in a Chinese population. *Journal of biomedical research* **26**: 315-318.

Liu ZX, Yu CF, Nickel C, Thomas S, Cantley LG (2002). Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. *The Journal of biological chemistry* **277**: 10452-10458.

Lock LS, Royal I, Naujokas MA, 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. *The Journal of biological chemistry* **275**: 31536-31545.

Lock LS, Frigault MM, Saucier C, Park M (2003). Grb2-independent recruitment of Gab1 requires the C-terminal lobe and structural integrity of the Met receptor kinase domain. *The Journal of biological chemistry* **278**: 30083-30090.

Lokker NA, Mark MR, Luis EA, Bennett GL, Robbins KA, Baker JB *et al* (1992). Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *The EMBO journal* **11**: 2503-2510.

Lokker NA, Presta LG, Godowski PJ (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 engineering* **7**: 895-903.

Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L, Comoglio PM (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, Comoglio PM (1996). Hepatocyte growth factor is a pleiotropic factor protecting epithelial cells from apoptosis. *Cell death and differentiation* **3**: 23-28.

Lortat-Jacob H, Fender P, Vivès RR (2005). Virus et héparane sulfate : des mécanismes d'adsorption cellulaire à l'entrée virale. *Virologie* **9**: 315-325.

Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA, Pandika MM, Aghi MK, Meyronet D *et al* (2012). VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer cell* **22**: 21-35.

Lyon M, Deakin JA, Mizuno K, Nakamura T, Gallagher JT (1994). Interaction of hepatocyte growth factor with heparan sulfate. Elucidation of the major heparan sulfate structural determinants. *The Journal of biological chemistry* **269**: 11216-11223.

Lyon M, Deakin JA, Rahmoune H, Fernig DG, Nakamura T, Gallagher JT (1998). Hepatocyte growth factor/scatter factor binds with high affinity to dermatan sulfate. *The Journal of biological chemistry* **273**: 271-278.

Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD *et al* (2003). c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer research* **63**: 6272-6281.

Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, Tretiakova MS, Nallasura V, Fox EA *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 research* **65**: 1479-1488.

Ma PC, Tretiakova MS, MacKinnon AC, Ramnath N, Johnson C, Dietrich S *et al* (2008). Expression and mutational analysis of MET in human solid cancers. *Genes, chromosomes & cancer* **47**: 1025-1037.

Madar S, Goldstein I, Rotter V (2013). 'Cancer associated fibroblasts'--more than meets the eye. *Trends in molecular medicine* **19**: 447-453.

Maggiora P, Lorenzato A, Fracchioli S, Costa B, Castagnaro M, Arisio R *et al* (2003). The RON and MET oncogenes are co-expressed in human ovarian carcinomas and cooperate in activating invasiveness. *Experimental cell research* **288**: 382-389.

Mahadev K, Zilbering A, Zhu L, Goldstein BJ (2001). Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *The Journal of biological chemistry* **276**: 21938-21942.

Mahon PC, Hirota K, Semenza GL (2001). FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes & development* **15**: 2675-2686.

Mahoney KM, Freeman GJ, McDermott DF (2015). The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma. *Clinical therapeutics* **37**: 764-782.

Maina F, Casagrande F, Audero E, Simeone A, Comoglio PM, Klein R *et al* (1996). Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* **87**: 531-542.

Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, Davies AM, Klein R (1997). Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes & development* **11**: 3341-3350.

Maina F, Pante G, Helmbacher F, Andres R, Porthin A, Davies AM *et al* (2001). Coupling Met to specific pathways results in distinct developmental outcomes. *Molecular cell* **7**: 1293-1306.

Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, Berger R, Xue Q, McMahon LM *et al* (2004). mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nature medicine* **10**: 594-601.

Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H *et al* (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* **414**: 550-554.

Mandriota SJ, Turner KJ, Davies DR, Murray PG, Morgan NV, Sowter HM *et al* (2002). HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer cell* **1**: 459-468.

Maroun CR, Naujokas MA, Holgado-Madruga M, Wong AJ, 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. *Molecular and cellular biology* **20**: 8513-8525.

Martens T, Schmidt NO, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R *et al* (2006). A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**: 6144-6152.

Martin V, Corso S, Comoglio PM, Giordano S (2014). Increase of MET gene copy number confers resistance to a monovalent MET antibody and establishes drug dependence. *Molecular oncology* **8**: 1561-1574.

Martins GJ, Shahrokh M, Powell EM (2011). Genetic disruption of Met signaling impairs GABAergic striatal development and cognition. *Neuroscience* **176**: 199-209.

Masola V, Secchi MF, Gambaro G, Onisto M (2014). Heparanase as a target in cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **14**: 286-293.

Matsumoto K, Nakamura T (2006). Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions. *International journal of cancer Journal international du cancer* **119**: 477-483.

Matteucci E, Castoldi R, Desiderio MA (2001). Hepatocyte growth factor induces proapoptotic genes in HepG2 hepatoma but not in B16-F1 melanoma cells. *Journal of cellular physiology* **186**: 387-396.

Matzke A, Sargsyan V, Holtmann B, Aramuni G, Asan E, Sendtner M *et al* (2007). Haploinsufficiency of c-Met in cd44^{-/-} mice identifies a collaboration of CD44 and c-Met in vivo. *Molecular and cellular biology* **27**: 8797-8806.

Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, Ma PC, Morrison PT, Salgia R (2002). Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine & growth factor reviews* **13**: 41-59.

Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ *et al* (1997). Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 8104-8109.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME *et al* (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**: 271-275.

- Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001). Activation of the HIF pathway in cancer. *Current opinion in genetics & development* **11**: 293-299.
- McDermott U, Sharma SV, Dowell L, Greninger P, Montagut C, Lamb J *et al* (2007). Identification of genotype-correlated sensitivity to selective kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 19936-19941.
- McDonnell LM, Kernohan KD, Boycott KM, Sawyer SL (2015). Receptor tyrosine kinase mutations in developmental syndromes and cancer: two sides of the same coin. *Human molecular genetics*.
- Medova M, Aebersold DM, Blank-Liss W, Streit B, Medo M, Aebi S *et al* (2010). MET Inhibition Results in DNA Breaks and Synergistically Sensitizes Tumor Cells to DNA-Damaging Agents Potentially by Breaching a Damage-Induced Checkpoint Arrest. *Genes & cancer* **1**: 1053-1062.
- Medova M, Aebersold DM, Zimmer Y (2012). MET inhibition in tumor cells by PHA665752 impairs homologous recombination repair of DNA double strand breaks. *International journal of cancer Journal international du cancer* **130**: 728-734.
- Meiners S, Brinkmann V, Naundorf H, Birchmeier W (1998). Role of morphogenetic factors in metastasis of mammary carcinoma cells. *Oncogene* **16**: 9-20.
- Melnyk O, Shuman MA, Kim KJ (1996). Vascular endothelial growth factor promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effect on primary tumor growth. *Cancer research* **56**: 921-924.
- Menard L, Parker PJ, Kermorgant S (2014). Receptor tyrosine kinase c-Met controls the cytoskeleton from different endosomes via different pathways. *Nature communications* **5**: 3907.
- Meng TC, Fukada T, Tonks NK (2002). Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Molecular cell* **9**: 387-399.
- Mercurio AM, Bachelder RE, Bates RC, Chung J (2004). Autocrine signaling in carcinoma: VEGF and the alpha6beta4 integrin. *Seminars in cancer biology* **14**: 115-122.
- Michalopoulos GK, DeFrances MC (1997). Liver regeneration. *Science* **276**: 60-66.
- Michieli P, Mazzone M, Basilico C, Cavassa S, Sottile A, Naldini L *et al* (2004). Targeting the tumor and its microenvironment by a dual-function decoy Met receptor. *Cancer cell* **6**: 61-73.
- Michieli P (2009). Hypoxia, angiogenesis and cancer therapy: to breathe or not to breathe? *Cell Cycle* **8**: 3291-3296.
- Migliore C, Petrelli A, Ghiso E, Corso S, Capparuccia L, Eramo A *et al* (2008). MicroRNAs impair MET-mediated invasive growth. *Cancer research* **68**: 10128-10136.

Mitamura T, Watari H, Wang L, Kanno H, Hassan MK, Miyazaki M *et al* (2013). Downregulation of miRNA-31 induces taxane resistance in ovarian cancer cells through increase of receptor tyrosine kinase MET. *Oncogenesis* **2**: e40.

Miyazawa K, Kitamura A, Naka D, Kitamura N (1991). An alternatively processed mRNA generated from human hepatocyte growth factor gene. *European journal of biochemistry / FEBS* **197**: 15-22.

Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura A, Kondo J, Morimoto Y, Kitamura N (1993). Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *The Journal of biological chemistry* **268**: 10024-10028.

Mizuno S, Nakamura T (2007). Hepatocyte growth factor: a regenerative drug for acute hepatitis and liver cirrhosis. *Regen Med* **2**: 161-170.

Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T (2008). HGF as a renoprotective and anti-fibrotic regulator in chronic renal disease. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**: 7072-7086.

Mizuno S, Nakamura T (2013). HGF-MET Cascade, a Key Target for Inhibiting Cancer Metastasis: The Impact of NK4 Discovery on Cancer Biology and Therapeutics. *International journal of molecular sciences* **14**: 888-919.

Momose K, Minami A, Shimono Y, Mizutani K, Nobutani K, Azuma T *et al* (2013). miR-214 and hypoxia down-regulate Necl-2/CADM1 and enhance ErbB2/ErbB3 signaling. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **18**: 195-202.

Montagne R, Furlan A, Kherrouche Z, Tulasne D (2014). [Thirty years of Met receptor research: from the discovery of an oncogene to the development of targeted therapies]. *Medecine sciences : M/S* **30**: 864-873.

Montagne R, Berbon M, Doublet L, Debreuck N, Baranzelli A, Drobecq H *et al* (2015). Necrosis- and apoptosis-related Met cleavages have divergent functional consequences. *Cell death & disease* **6**: e1769.

Montesano R, Schaller G, Orci L (1991). Induction of epithelial tubular morphogenesis in vitro by fibroblast-derived soluble factors. *Cell* **66**: 697-711.

Montesano R, Soriano JV, Malinda KM, Ponce ML, Bafico A, Kleinman HK *et al* (1998). Differential effects of hepatocyte growth factor isoforms on epithelial and endothelial tubulogenesis. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **9**: 355-365.

Morris MR, Gentle D, Abdulrahman M, Maina EN, Gupta K, Banks RE *et al* (2005). Tumor suppressor activity and epigenetic inactivation of hepatocyte growth factor activator

inhibitor type 2/SPINT2 in papillary and clear cell renal cell carcinoma. *Cancer research* **65**: 4598-4606.

Mueller KL, Hunter LA, Ethier SP, Boerner JL (2008). Met and c-Src cooperate to compensate for loss of epidermal growth factor receptor kinase activity in breast cancer cells. *Cancer research* **68**: 3314-3322.

Mueller KL, Yang ZQ, Haddad R, Ethier SP, Boerner JL (2010). EGFR/Met association regulates EGFR TKI resistance in breast cancer. *Journal of molecular signaling* **5**: 8.

Mueller MM, Fusenig NE (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature reviews Cancer* **4**: 839-849.

Muharram G, Sahgal P, Korpela T, De Franceschi N, Kaukonen R, Clark K *et al* (2014). Tensin-4-dependent MET stabilization is essential for survival and proliferation in carcinoma cells. *Developmental cell* **29**: 421-436.

Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Zhou XM, Foster D, Brugge JS, Sukhatme VP (1995). Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* **375**: 577-581.

Murakami A, Takahashi F, Nurwidya F, Kobayashi I, Minakata K, Hashimoto M *et al* (2014). Hypoxia increases gefitinib-resistant lung cancer stem cells through the activation of insulin-like growth factor 1 receptor. *PloS one* **9**: e86459.

Nakade J, Takeuchi S, Nakagawa T, Ishikawa D, Sano T, Nanjo S *et al* (2014). Triple inhibition of EGFR, Met, and VEGF suppresses regrowth of HGF-triggered, erlotinib-resistant lung cancer harboring an EGFR mutation. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **9**: 775-783.

Nakaigawa N, Yao M, Baba M, Kato S, Kishida T, Hattori K *et al* (2006). Inactivation of von Hippel-Lindau gene induces constitutive phosphorylation of MET protein in clear cell renal carcinoma. *Cancer research* **66**: 3699-3705.

Nakamura T, Nawa K, Ichihara A (1984). Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochemical and biophysical research communications* **122**: 1450-1459.

Nakamura T, Nawa K, Ichihara A, Kaise N, Nishino T (1987). Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS letters* **224**: 311-316.

Nakamura T (1991). Structure and function of hepatocyte growth factor. *Progress in growth factor research* **3**: 67-85.

Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T (2000). Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *The Journal of clinical investigation* **106**: 1511-1519.

- Nakayama M, Takahashi K, Kitamuro T, Yasumoto K, Katayose D, Shirato K *et al* (2000). Repression of heme oxygenase-1 by hypoxia in vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* **271**: 665-671.
- Naldini L, Vigna E, Ferracini R, Longati P, Gandino L, Prat M *et al* (1991a). The tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene is activated by autophosphorylation. *Molecular and cellular biology* **11**: 1793-1803.
- Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK *et al* (1991b). 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 KM, Vigna E, Gaudino G, Bardelli A, Ponzetto C *et al* (1991c). Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *The EMBO journal* **10**: 2867-2878.
- Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W *et al* (1992). Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *The EMBO journal* **11**: 4825-4833.
- Nardella C, Lahm A, Pallaoro M, Brunetti M, Vannini A, Steinkuhler C (2004). Mechanism of activation of human heparanase investigated by protein engineering. *Biochemistry* **43**: 1862-1873.
- Nasser NJ, Nevo E, Shafat I, Ilan N, Vlodavsky I, Avivi A (2005). Adaptive evolution of heparanase in hypoxia-tolerant Spalax: gene cloning and identification of a unique splice variant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 15161-15166.
- Natali PG, Prat M, Nicotra MR, Bigotti A, Olivero M, Comoglio PM *et al* (1996). Overexpression of the met/HGF receptor in renal cell carcinomas. *International journal of cancer Journal international du cancer* **69**: 212-217.
- Navab R, Liu J, Seiden-Long I, Shih W, Li M, Bandarchi B *et al* (2009). Co-overexpression of Met and hepatocyte growth factor promotes systemic metastasis in NCI-H460 non-small cell lung carcinoma cells. *Neoplasia* **11**: 1292-1300.
- Neill T, Painter H, Buraschi S, Owens RT, Lisanti MP, Schaefer L *et al* (2012). Decorin antagonizes the angiogenic network: concurrent inhibition of Met, hypoxia inducible factor 1alpha, vascular endothelial growth factor A, and induction of thrombospondin-1 and TIMP3. *The Journal of biological chemistry* **287**: 5492-5506.
- Neufeld G, Sabag AD, Rabinovicz N, Kessler O (2012). Semaphorins in angiogenesis and tumor progression. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**: a006718.
- Niki M, Isozaki H, Toyoda M, Ishibashi T, Fujii K, Nomura E *et al* (1999). Serum human hepatocyte growth factor (hHGF) is elevated in patients with metastatic gastric carcinoma. *Hepato-gastroenterology* **46**: 568-573.

O'Brien LE, Tang K, Kats ES, Schutz-Geschwender A, Lipschutz JH, Mostov KE (2004). ERK and MMPs sequentially regulate distinct stages of epithelial tubule development. *Developmental cell* **7**: 21-32.

Ohmichi H, Matsumoto K, Nakamura T (1996). In vivo mitogenic action of HGF on lung epithelial cells: pulmotrophic role in lung regeneration. *The American journal of physiology* **270**: L1031-1039.

Ollivier N, Vicogne J, Vallin A, Drobecq H, Desmet R, El Mahdi O *et al* (2012). A one-pot three-segment ligation strategy for protein chemical synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**: 209-213.

Onozato R, Kosaka T, Kuwano H, Sekido Y, Yatabe Y, Mitsudomi T (2009). Activation of MET by gene amplification or by splice mutations deleting the juxtamembrane domain in primary resected lung cancers. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **4**: 5-11.

Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP, Herrlich P, Ponta H (2002). CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes & development* **16**: 3074-3086.

Orian-Rousseau V, Morrison H, Matzke A, Kastilan T, Pace G, Herrlich P *et al* (2007). Hepatocyte growth factor-induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44v6 and F-actin. *Molecular biology of the cell* **18**: 76-83.

Ostman A, Frijhoff J, Sandin A, Bohmer FD (2011). Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation. *Journal of biochemistry* **150**: 345-356.

Ou SH, Kwak EL, Siwak-Tapp C, Dy J, Bergethon K, Clark JW *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. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **6**: 942-946.

Owen KA, Qiu D, Alves J, Schumacher AM, Kilpatrick LM, Li J *et al* (2010). Pericellular activation of hepatocyte growth factor by the transmembrane serine proteases matriptase and hepsin, but not by the membrane-associated protease uPA. *The Biochemical journal* **426**: 219-228.

Paatero I, Seagroves TN, Vaparanta K, Han W, Jones FE, Johnson RS *et al* (2014). Hypoxia-inducible factor-1alpha induces ErbB4 signaling in the differentiating mammary gland. *The Journal of biological chemistry* **289**: 22459-22469.

Pacchiana G, Chiriaco C, Stella MC, Petronzelli F, De Santis R, Galluzzo M *et al* (2010). Monovalency unleashes the full therapeutic potential of the DN-30 anti-Met antibody. *The Journal of biological chemistry* **285**: 36149-36157.

Paik PK, Drilon A, Fan PD, Yu H, Rekhtman N, Ginsberg MS *et al* (2015). Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer discovery*.

Palamidessi A, Frittoli E, Garre M, Faretta M, Mione M, Testa I *et al* (2008). Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell* **134**: 135-147.

Palka HL, Park M, Tonks NK (2003). Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *The Journal of biological chemistry* **278**: 5728-5735.

Pani G, Galeotti T, Chiarugi P (2010). Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer metastasis reviews* **29**: 351-378.

Parachoniak CA, Luo Y, Abella JV, Keen JH, Park M (2011). GGA3 functions as a switch to promote Met receptor recycling, essential for sustained ERK and cell migration. *Developmental cell* **20**: 751-763.

Park M, Dean M, Cooper CS, Schmidt M, O'Brien SJ, Blair DG *et al* (1986). Mechanism of met oncogene activation. *Cell* **45**: 895-904.

Park M, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda MA, Vande Woude G (1987). Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 6379-6383.

Park M, Park H, Kim WH, Cho H, Lee JH (2005). Presence of autocrine hepatocyte growth factor-Met signaling and its role in proliferation and migration of SNU-484 gastric cancer cell line. *Experimental & molecular medicine* **37**: 213-219.

Pelicci G, Giordano S, Zhen Z, Salcini AE, Lanfrancone L, Bardelli A *et al* (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, Qiu S (2013). MET receptor tyrosine kinase as an autism genetic risk factor. *International review of neurobiology* **113**: 135-165.

Peng Z, Zhu Y, Wang Q, Gao J, Li Y, Li Y *et al* (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, Comoglio PM (2003). Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer cell* **3**: 347-361.

Pennacchietti S, Cazzanti M, Bertotti A, Rideout WM, 3rd, Han M, Gyuris J *et al* (2014). Microenvironment-derived HGF overcomes genetically determined sensitivity to anti-MET drugs. *Cancer research* **74**: 6598-6609.

Peschard P, Fournier TM, Lamorte L, Naujokas MA, Band H, Langdon WY *et al* (2001). Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Molecular cell* **8**: 995-1004.

Peschard P, Park M (2007). From Tpr-Met to Met, tumorigenesis and tubes. *Oncogene* **26**: 1276-1285.

Petrelli A, Gilestro GF, Lanzardo S, Comoglio PM, Migone N, 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 *et al* (2006). Ab-induced ectodomain shedding mediates hepatocyte growth factor receptor down-regulation and hampers biological activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 5090-5095.

Pietras K, Ostman A (2010). Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Experimental cell research* **316**: 1324-1331.

Polier S, Samant RS, Clarke PA, Workman P, Prodromou C, Pearl LH (2013). ATP-competitive inhibitors block protein kinase recruitment to the Hsp90-Cdc37 system. *Nature chemical biology* **9**: 307-312.

Ponta H, Sherman L, Herrlich PA (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature reviews Molecular cell biology* **4**: 33-45.

Ponzetto C, Giordano S, Peverali F, Della Valle G, Abate ML, Vaula G *et al* (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 *et al* (1994). A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* **77**: 261-271.

Ponzo MG, Lesurf R, Petkiewicz S, O'Malley FP, Pinnaduwege D, Andrulis IL *et al* (2009). Met induces mammary tumors with diverse histologies and is associated with poor outcome and human basal breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 12903-12908.

Popsueva A, Poteryaev D, Arighi E, Meng X, Angers-Loustau A, Kaplan D *et al* (2003). GDNF promotes tubulogenesis of GFRalpha1-expressing MDCK cells by Src-mediated phosphorylation of Met receptor tyrosine kinase. *The Journal of cell biology* **161**: 119-129.

Postovit LM, Adams MA, Lash GE, Heaton JP, Graham CH (2002). Oxygen-mediated regulation of tumor cell invasiveness. Involvement of a nitric oxide signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* **277**: 35730-35737.

Prat M, Crepaldi T, Pennacchietti S, Bussolino F, Comoglio PM (1998). Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *Journal of cell science* **111 (Pt 2)**: 237-247.

Prunotto C, Crepaldi T, Forni PE, Ieraci A, Kelly RG, Tajbakhsh S *et al* (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. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **231**: 582-591.

Qi J, McTigue MA, Rogers A, Lifshits E, Christensen JG, Janne PA *et al* (2011). Multiple mutations and bypass mechanisms can contribute to development of acquired resistance to MET inhibitors. *Cancer research* **71**: 1081-1091.

Qiu D, Owen K, Gray K, Bass R, Ellis V (2007). Roles and regulation of membrane-associated serine proteases. *Biochemical Society transactions* **35**: 583-587.

Rabkin R, Fervenza F, Tsao T, Sibley R, Friedlaender M, Hsu F *et al* (2001). Hepatocyte growth factor receptor in acute tubular necrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **12**: 531-540.

Rahimi N, Hung W, Tremblay E, Saulnier R, Elliott B (1998). c-Src kinase activity is required for hepatocyte growth factor-induced motility and anchorage-independent growth of mammary carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* **273**: 33714-33721.

Raibaut L, Vicogne J, Leclercq B, Drobecq H, Desmet R, Melnyk O (2013). Total synthesis of biotinylated N domain of human hepatocyte growth factor. *Bioorganic & medicinal chemistry* **21**: 3486-3494.

Rankin EB, Fuh KC, Castellini L, Viswanathan K, Finger EC, Diep AN *et al* (2014). Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 13373-13378.

Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL *et al* (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Molecular and cellular biology* **25**: 5675-5686.

Recio JA, 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.

Reshetnikova G, Troyanovsky S, Rimm DL (2007). Definition of a direct extracellular interaction between Met and E-cadherin. *Cell biology international* **31**: 366-373.

Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J (1999). p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and

enhance the transcriptional activity of HIF-1. *The Journal of biological chemistry* **274**: 32631-32637.

Rodrigues GA, Park M (1993). Dimerization mediated through a leucine zipper activates the oncogenic potential of the met receptor tyrosine kinase. *Molecular and cellular biology* **13**: 6711-6722.

Rodrigues GA, Park M, Schlessinger J (1997). Activation of the JNK pathway is essential for transformation by the Met oncogene. *The EMBO journal* **16**: 2634-2645.

Rofstad EK, Danielsen T (1999). Hypoxia-induced metastasis of human melanoma cells: involvement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *British journal of cancer* **80**: 1697-1707.

Rofstad EK, Tunheim SH, Mathiesen B, Graff BA, Halsor EF, Nilsen K *et al* (2002). Pulmonary and lymph node metastasis is associated with primary tumor interstitial fluid pressure in human melanoma xenografts. *Cancer research* **62**: 661-664.

Rong S, Segal S, Anver M, Resau JH, Vande Woude GF (1994). Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 4731-4735.

Rosario M, Birchmeier W (2003). How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends in cell biology* **13**: 328-335.

Rubin JS, Day RM, Breckenridge D, Atabey N, Taylor WG, Stahl SJ *et al* (2001). Dissociation of heparan sulfate and receptor binding domains of hepatocyte growth factor reveals that heparan sulfate-c-met interaction facilitates signaling. *The Journal of biological chemistry* **276**: 32977-32983.

Sachs M, Brohmann H, Zechner D, Muller T, Hulsken J, Walther I *et al* (2000). Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo. *The Journal of cell biology* **150**: 1375-1384.

Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K, Nakamura T (2009). Angioinhibitory action of NK4 involves impaired extracellular assembly of fibronectin mediated by perlecan-NK4 association. *The Journal of biological chemistry* **284**: 22491-22499.

Sakata H, Stahl SJ, Taylor WG, Rosenberg JM, Sakaguchi K, Wingfield PT *et al* (1997). Heparin binding and oligomerization of hepatocyte growth factor/scatter factor isoforms. Heparan sulfate glycosaminoglycan requirement for Met binding and signaling. *The Journal of biological chemistry* **272**: 9457-9463.

Salceda S, Caro J (1997). Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *The Journal of biological chemistry* **272**: 22642-22647.

Salmeen A, Andersen JN, Myers MP, Tonks NK, Barford D (2000). Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *Molecular cell* **6**: 1401-1412.

Sandin A, Dagnell M, Gonon A, Pernow J, Stangl V, Aspenstrom P *et al* (2011). Hypoxia followed by re-oxygenation induces oxidation of tyrosine phosphatases. *Cellular signalling* **23**: 820-826.

Sangwan V, Paliouras GN, Cheng A, Dube N, Tremblay ML, Park M (2006). Protein-tyrosine phosphatase 1B deficiency protects against Fas-induced hepatic failure. *The Journal of biological chemistry* **281**: 221-228.

Sangwan V, Paliouras GN, Abella JV, Dube N, Monast A, Tremblay ML *et al* (2008). Regulation of the Met receptor-tyrosine kinase by the protein-tyrosine phosphatase 1B and T-cell phosphatase. *The Journal of biological chemistry* **283**: 34374-34383.

Sangwan V, Abella J, Lai A, Bertos N, Stuble M, Tremblay ML *et al* (2011). Protein-tyrosine phosphatase 1B modulates early endosome fusion and trafficking of Met and epidermal growth factor receptors. *The Journal of biological chemistry* **286**: 45000-45013.

Santoro A, Rimassa L, Borbath I, Daniele B, Salvagni S, Van Laethem JL *et al* (2013). Tivantinib for second-line treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a randomised, placebo-controlled phase 2 study. *The Lancet Oncology* **14**: 55-63.

Sattler M, Pride YB, Ma P, Gramlich JL, Chu SC, Quinnan LA *et al* (2003). A novel small molecule met inhibitor induces apoptosis in cells transformed by the oncogenic TPR-MET tyrosine kinase. *Cancer research* **63**: 5462-5469.

Saucier C, Khoury H, Lai KM, Peschard P, Dankort D, Naujokas MA *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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 2345-2350.

Sawyers C (2004). Targeted cancer therapy. *Nature* **432**: 294-297.

Scagliotti GV, Novello S, von Pawel J (2013). The emerging role of MET/HGF inhibitors in oncology. *Cancer treatment reviews* **39**: 793-801.

Scarpino S, Cancellario d'Alena F, Di Napoli A, Pasquini A, Marzullo A, Ruco LP (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. *The Journal of pathology* **202**: 352-358.

Schaeper U, Gehring NH, Fuchs KP, Sachs M, Kempkes B, Birchmeier W (2000). Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *The Journal of cell biology* **149**: 1419-1432.

Schelter F, Kobuch J, Moss ML, Becherer JD, Comoglio PM, Boccaccio C *et al* (2010). A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor. *The Journal of biological chemistry* **285**: 26335-26340.

Schiering N, Knapp S, Marconi M, Flocco MM, Cui J, Perego R *et al* (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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 12654-12659.

Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M *et al* (2002). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **8**: 1831-1837.

Schito L, Rey S, Tafani M, Zhang H, Wong CC, Russo A *et al* (2012). Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of platelet-derived growth factor B promotes lymphatic metastasis of hypoxic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: E2707-2716.

Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M *et al* (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* **373**: 699-702.

Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P *et al* (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nature genetics* **16**: 68-73.

Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N, Kinjerski T, Weirich G, Miller M *et al* (1999). Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene* **18**: 2343-2350.

Schoffski P, Garcia JA, Stadler WM, Gil T, Jonasch E, Tagawa ST *et al* (2011). A phase II study of the efficacy and safety of AMG 102 in patients with metastatic renal cell carcinoma. *BJU international* **108**: 679-686.

Seki T, Hagiya M, Shimonishi M, Nakamura T, Shimizu S (1991). Organization of the human hepatocyte growth factor-encoding gene. *Gene* **102**: 213-219.

Semenza GL, Wang GL (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology* **12**: 5447-5454.

Semenza GL (2002). HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in molecular medicine* **8**: S62-67.

Semenza GL (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews Cancer* **3**: 721-732.

Semenza GL (2007). Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug discovery today* **12**: 853-859.

Sennino B, Ishiguro-Oonuma T, Wei Y, Naylor RM, Williamson CW, Bhagwandin V *et al* (2012). Suppression of tumor invasion and metastasis by concurrent inhibition of c-Met and VEGF signaling in pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer discovery* **2**: 270-287.

Seo JS, Ju YS, Lee WC, Shin JY, Lee JK, Bleazard T *et al* (2012). The transcriptional landscape and mutational profile of lung adenocarcinoma. *Genome research* **22**: 2109-2119.

Sequist LV, von Pawel J, Garmey EG, Akerley WL, Brugger W, Ferrari D *et al* (2011). Randomized phase II study of erlotinib plus tivantinib versus erlotinib plus placebo in previously treated non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**: 3307-3315.

Serrate C, Watson S, Vignot S (2011). [MET: new target, new combinations]. *Bull Cancer* **98**: 689-696.

Seta KA, Spicer Z, Yuan Y, Lu G, Millhorn DE (2002). Responding to hypoxia: lessons from a model cell line. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2002**: re11.

Shattuck DL, Miller JK, Laederich M, Funes M, Petersen H, Carraway KL, 3rd *et al* (2007). LRIG1 is a novel negative regulator of the Met receptor and opposes Met and Her2 synergy. *Molecular and cellular biology* **27**: 1934-1946.

Shattuck DL, Miller JK, Carraway KL, 3rd, Sweeney C (2008). Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer research* **68**: 1471-1477.

Shen Y, Naujokas M, Park M, Ireton K (2000). InIB-dependent internalization of Listeria is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**: 501-510.

Shieh JM, Tang YA, Yang TH, Chen CY, Hsu HS, Tan YH *et al* (2013). Lack of association of C-Met-N375S sequence variant with lung cancer susceptibility and prognosis. *International journal of medical sciences* **10**: 988-994.

Shimamura M, Sato N, Sata M, Wakayama K, Ogihara T, Morishita R (2007). Expression of hepatocyte growth factor and c-Met after spinal cord injury in rats. *Brain research* **1151**: 188-194.

Shimizu M, Hara A, Okuno M, Matsuno H, Okada K, Ueshima S *et al* (2001). Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis. *Hepatology* **33**: 569-576.

Shimomura T, Kondo J, Ochiai M, Naka D, Miyazawa K, Morimoto Y *et al* (1993). Activation of the zymogen of hepatocyte growth factor activator by thrombin. *The Journal of biological chemistry* **268**: 22927-22932.

Shimomura T, Denda K, Kitamura A, Kawaguchi T, Kito M, Kondo J *et al* (1997). Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a novel Kunitz-type serine protease inhibitor. *The Journal of biological chemistry* **272**: 6370-6376.

Siegfried JM, Weissfeld LA, Singh-Kaw P, Weyant RJ, Testa JR, Landreneau RJ (1997). Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer. *Cancer research* **57**: 433-439.

Simiantonaki N, Jayasinghe C, Michel-Schmidt R, Peters K, Hermanns MI, Kirkpatrick CJ (2008). Hypoxia-induced epithelial VEGF-C/VEGFR-3 upregulation in carcinoma cell lines. *International journal of oncology* **32**: 585-592.

Simon MC (2006). Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxic HIF alpha stabilization. *Advances in experimental medicine and biology* **588**: 165-170.

Simon MC, Keith B (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**: 285-296.

Simonneau C, Leclercq B, Mougel A, Adriaenssens E, Paquet C, Raibaut L *et al* (2015). Semi-synthesis of a HGF/SF kringle one (K1) domain scaffold generates a potent in vivo MET receptor agonist. *Chemical Science* **6**: 2110-2121.

Sivridis E, Giatromanolaki A, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI (2002). Association of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha with activated angiogenic pathways and prognosis in patients with endometrial carcinoma. *Cancer* **95**: 1055-1063.

Skead G, Govender D (2015). Gene of the month: MET. *Journal of clinical pathology* **68**: 405-409.

Smolen GA, Sordella R, Muir B, Mohapatra G, Barmettler A, Archibald H *et al* (2006). Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 2316-2321.

Smyth LA, Brady HJ (2005). cMet and Fas receptor interaction inhibits death-inducing signaling complex formation in endothelial cells. *Hypertension* **46**: 100-106.

Sonnenberg E, Meyer D, Weidner KM, 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. *The Journal of cell biology* **123**: 223-235.

Soong J, Chen Y, Shustef EM, Scott GA (2012). Sema4D, the ligand for Plexin B1, suppresses c-Met activation and migration and promotes melanocyte survival and growth. *The Journal of investigative dermatology* **132**: 1230-1238.

Soong J, Scott G (2013). Plexin B1 inhibits MET through direct association and regulates Shp2 expression in melanocytes. *Journal of cell science* **126**: 688-695.

Spigel DR, Ervin TJ, Ramlau RA, Daniel DB, Goldschmidt JH, Jr., Blumenschein GR, Jr. *et al* (2013). Randomized phase II trial of Onartuzumab in combination with erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**: 4105-4114.

Spigel DR, Edelman MJ, O'Byrne K, Paz-Ares L, Shames DS, Yu W *et al* (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**.

Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W (2003). Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* **425**: 307-311.

Stamos J, Lazarus RA, Yao X, Kirchhofer D, Wiesmann C (2004). Crystal structure of the HGF beta-chain in complex with the Sema domain of the Met receptor. *The EMBO journal* **23**: 2325-2335.

Stella MC, Comoglio PM (1999). HGF: a multifunctional growth factor controlling cell scattering. *The international journal of biochemistry & cell biology* **31**: 1357-1362.

Stevens L, McClelland L, Fricke A, Williamson M, Kuo I, 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. *The Journal of investigative dermatology* **130**: 1636-1645.

Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J (1987). Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* **327**: 239-242.

Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J *et al* (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* **487**: 500-504.

Suda K, Murakami I, Katayama T, Tomizawa K, Osada H, Sekido Y *et al* (2010). Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**: 5489-5498.

Sullivan R, Graham CH (2007). Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer metastasis reviews* **26**: 319-331.

Sulpice E, Ding S, Muscatelli-Groux B, Berge M, Han ZC, Plouet J *et al* (2009). Cross-talk between the VEGF-A and HGF signalling pathways in endothelial cells. *Biol Cell* **101**: 525-539.

Swinson DE, O'Byrne KJ (2006). Interactions between hypoxia and epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer. *Clinical lung cancer* **7**: 250-256.

- Tacchini L, Dansi P, Matteucci E, Desiderio MA (2001). Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. *Carcinogenesis* **22**: 1363-1371.
- Tacchini L, De Ponti C, Matteucci E, Follis R, Desiderio MA (2004). Hepatocyte growth factor-activated NF-kappaB regulates HIF-1 activity and ODC expression, implicated in survival, differently in different carcinoma cell lines. *Carcinogenesis* **25**: 2089-2100.
- Taddei ML, Giannoni E, Comito G, Chiarugi P (2013). Microenvironment and tumor cell plasticity: an easy way out. *Cancer letters* **341**: 80-96.
- Taher TE, Tjin EP, Beuling EA, Borst J, Spaargaren M, Pals ST (2002). c-Cbl is involved in Met signaling in B cells and mediates hepatocyte growth factor-induced receptor ubiquitination. *J Immunol* **169**: 3793-3800.
- Takayama H, LaRochelle WJ, Sharp R, Otsuka T, Kriebel P, Anver M *et al* (1997). Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 701-706.
- Takeuchi S, Wang W, Li Q, Yamada T, Kita K, Donev IS *et al* (2012). Dual inhibition of Met kinase and angiogenesis to overcome HGF-induced EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung cancer. *The American journal of pathology* **181**: 1034-1043.
- Tanaka N, Kyuuma M, Sugamura K (2008). Endosomal sorting complex required for transport proteins in cancer pathogenesis, vesicular transport, and non-endosomal functions. *Cancer science* **99**: 1293-1303.
- Tate A, Isotani S, Bradley MJ, Sikes RA, Davis R, Chung LW *et al* (2006). Met-Independent Hepatocyte Growth Factor-mediated regulation of cell adhesion in human prostate cancer cells. *BMC cancer* **6**: 197.
- Tempest PR, Stratton MR, Cooper CS (1988). Structure of the met protein and variation of met protein kinase activity among human tumour cell lines. *British journal of cancer* **58**: 3-7.
- ten Freyhaus H, Dagnell M, Leuchs M, Vantler M, Berghausen EM, Caglayan E *et al* (2011). Hypoxia enhances platelet-derived growth factor signaling in the pulmonary vasculature by down-regulation of protein tyrosine phosphatases. *American journal of respiratory and critical care medicine* **183**: 1092-1102.
- Teng L, Lu J (2013). cMET as a potential therapeutic target in gastric cancer (Review). *International journal of molecular medicine* **32**: 1247-1254.
- Thangasamy A, Rogge J, Ammanamanchi S (2009). Recepteur d'origine nantais tyrosine kinase is a direct target of hypoxia-inducible factor-1alpha-mediated invasion of breast carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* **284**: 14001-14010.

Thomas GV, Tran C, Mellinghoff IK, Welsbie DS, Chan E, Fueger B *et al* (2006). Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nature medicine* **12**: 122-127.

Tian H, McKnight SL, Russell DW (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & development* **11**: 72-82.

Toi M, Taniguchi T, Ueno T, Asano M, Funata N, Sekiguchi K *et al* (1998). Significance of circulating hepatocyte growth factor level as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **4**: 659-664.

Toiyama Y, Miki C, Inoue Y, Okugawa Y, Tanaka K, Kusunoki M (2009). Serum hepatocyte growth factor as a prognostic marker for stage II or III colorectal cancer patients. *International journal of cancer Journal international du cancer* **125**: 1657-1662.

Tokunou M, Niki T, Eguchi K, Iba S, Tsuda H, Yamada T *et al* (2001). c-MET expression in myofibroblasts: role in autocrine activation and prognostic significance in lung adenocarcinoma. *The American journal of pathology* **158**: 1451-1463.

Tolbert WD, Daugherty-Holtrop J, Gherardi E, Vande Woude G, Xu HE (2010). Structural basis for agonism and antagonism of hepatocyte growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 13264-13269.

Tonks NK (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature reviews Molecular cell biology* **7**: 833-846.

Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH *et al* (2014). Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **32**: 1020-1030.

Toschi L, Cappuzzo F (2010). Clinical implications of MET gene copy number in lung cancer. *Future Oncol* **6**: 239-247.

Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM (2001). A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell* **107**: 643-654.

Trusolino L, Comoglio PM (2002). Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nature reviews Cancer* **2**: 289-300.

Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM (2010). MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 834-848.

Tsuta K, Kozu Y, Mimae T, Yoshida A, Kohno T, Sekine I *et al* (2012). c-MET/phospho-MET protein expression and MET gene copy number in non-small cell lung carcinomas.

Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer **7**: 331-339.

Tulasne D, Paumelle R, Weidner KM, Vandebunder B, Fafeur V (1999). The multisubstrate docking site of the MET receptor is dispensable for MET-mediated RAS signaling and cell scattering. *Molecular biology of the cell* **10**: 551-565.

Tulasne D, Paumelle R, Leroy C, Reveneau S, Vandebunder B, Fafeur V (2002). Involvement of RAS-ERK signaling in multiple biological responses to HGF/SF. *Annals of the New York Academy of Sciences* **973**: 105-108.

Tulasne D, Deheuninck J, Lourenco FC, Lamballe F, Ji Z, Leroy C *et al* (2004). Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. *Molecular and cellular biology* **24**: 10328-10339.

Tulasne D, Foveau B (2008). The shadow of death on the MET tyrosine kinase receptor. *Cell death and differentiation* **15**: 427-434.

Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E *et al* (2010). Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer cell* **17**: 77-88.

Tyner JW, Fletcher LB, Wang EQ, Yang WF, Rutenberg-Schoenberg ML, Beadling C *et al* (2010). MET receptor sequence variants R970C and T992I lack transforming capacity. *Cancer research* **70**: 6233-6237.

Uchida D, Kawamata H, Omotehara F, Nakashiro K, Kimura-Yanagawa T, Hino S *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. *International journal of cancer Journal international du cancer* **93**: 489-496.

Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T *et al* (1995). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* **373**: 702-705.

Ullrich A, Schlessinger J (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**: 203-212.

Valente G, Nicotra G, Arrondini M, Castino R, Capparuccia L, Prat M *et al* (2009). Co-expression of plexin-B1 and Met in human breast and ovary tumours enhances the risk of progression. *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology* **31**: 423-436.

van der Voort R, Taher TE, Wielenga VJ, Spaargaren M, Prevo R, Smit L *et al* (1999). Heparan sulfate-modified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor-induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met. *The Journal of biological chemistry* **274**: 6499-6506.

- Vanhaesebroeck B, Ali K, Bilancio A, Geering B, Foukas LC (2005). Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends in biochemical sciences* **30**: 194-204.
- Varkaris A, Gaur S, Parikh NU, Song JH, Dayyani F, Jin JK *et al* (2013). Ligand-independent activation of MET through IGF-1/IGF-1R signaling. *International journal of cancer Journal international du cancer* **133**: 1536-1546.
- Vassal G, Ledelely M-C, Tournigand C, Aparicio T, Ray-Coquard I, Taillandier L *et al* (2015). Activity of crizotinib in relapsed MET amplified malignancies: results of the French AcSé Program. *ASCO conference*.
- Vaupel P, Mayer A (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer metastasis reviews* **26**: 225-239.
- Veiga E, Cossart P (2005). Listeria hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nature cell biology* **7**: 894-900.
- Vigna E, Comoglio PM (2015). Targeting the oncogenic Met receptor by antibodies and gene therapy. *Oncogene* **34**: 1883-1889.
- Viticchie G, Muller PAJ (2015). c-Met and other cell surface molecules: interaction, activation and functional consequences. *Biomedicines* **3**: 46-70.
- Vlodavsky I, Bar-Shavit R, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Fuks Z (1991). Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism? *Trends in biochemical sciences* **16**: 268-271.
- Vlodavsky I, Beckhove P, Lerner I, Pisano C, Meirovitz A, Ilan N *et al* (2012). Significance of heparanase in cancer and inflammation. *Cancer Microenviron* **5**: 115-132.
- Volm M, Koomagi R (2000). Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer research* **20**: 1527-1533.
- Wang GL, Semenza GL (1993). Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *The Journal of biological chemistry* **268**: 21513-21518.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 5510-5514.
- Wang JF, Gong K, Wei DQ, Li YX, Chou KC (2009a). Molecular dynamics studies on the interactions of PTP1B with inhibitors: from the first phosphate-binding site to the second one. *Protein engineering, design & selection : PEDS* **22**: 349-355.
- Wang R, Ferrell LD, Faouzi S, Maher JJ, Bishop JM (2001). Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *The Journal of cell biology* **153**: 1023-1034.

Wang W, Marimuthu A, Tsai J, Kumar A, Krupka HI, Zhang C *et al* (2006). Structural characterization of autoinhibited c-Met kinase produced by coexpression in bacteria with phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 3563-3568.

Wang X, DeFrances MC, Dai Y, Padiaditakis P, Johnson C, Bell A *et al* (2002). A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Molecular cell* **9**: 411-421.

Wang X, Schneider A (2010). HIF-2alpha-mediated activation of the epidermal growth factor receptor potentiates head and neck cancer cell migration in response to hypoxia. *Carcinogenesis* **31**: 1202-1210.

Wang Y, Roche O, Yan MS, Finak G, Evans AJ, Metcalf JL *et al* (2009b). Regulation of endocytosis via the oxygen-sensing pathway. *Nature medicine* **15**: 319-324.

Wartenberg M, Ling FC, Muschen M, Klein F, Acker H, Gassmann M *et al* (2003). Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**: 503-505.

Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL (2011). Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nature reviews Cancer* **11**: 671-677.

Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, Vandekerckhove J, Weingart S, Rieder H *et al* (1991). Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 7001-7005.

Weidner KM, Sachs M, Riethmacher D, Birchmeier W (1995). Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 2597-2601.

Weidner KM, Di Cesare S, Sachs M, Brinkmann V, Behrens J, Birchmeier W (1996). Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* **384**: 173-176.

Weinstein IB, Joe AK (2006). Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature clinical practice Oncology* **3**: 448-457.

Weinstein IB, Joe A (2008). Oncogene addiction. *Cancer research* **68**: 3077-3080; discussion 3080.

Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresh D (2004). Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *The Journal of cell biology* **167**: 223-229.

Welsh JW, Mahadevan D, Ellsworth R, Cooke L, Bearss D, Stea B (2009). The c-Met receptor tyrosine kinase inhibitor MP470 radiosensitizes glioblastoma cells. *Radiat Oncol* **4**: 69.

Wen PY, Schiff D, Cloughesy TF, Raizer JJ, Laterra J, Smitt M *et al* (2011). A phase II study evaluating the efficacy and safety of AMG 102 (rilotumumab) in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology* **13**: 437-446.

Wielenga VJ, van der Voort R, Taher TE, Smit L, Beuling EA, van Krimpen C *et al* (2000). Expression of c-Met and heparan-sulfate proteoglycan forms of CD44 in colorectal cancer. *The American journal of pathology* **157**: 1563-1573.

Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C *et al* (2003). Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**: 271-273.

Wilhelmsen K, Litjens SH, Sonnenberg A (2006). Multiple functions of the integrin alpha6beta4 in epidermal homeostasis and tumorigenesis. *Molecular and cellular biology* **26**: 2877-2886.

Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E *et al* (2012). Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* **487**: 505-509.

Wilson WR, Hay MP (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature reviews Cancer* **11**: 393-410.

Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM *et al* (2013). Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *The New England journal of medicine* **369**: 122-133.

Wouters A, Pauwels B, Lardon F, Vermorken JB (2007). Review: implications of in vitro research on the effect of radiotherapy and chemotherapy under hypoxic conditions. *The oncologist* **12**: 690-712.

Wu W, Pan C, Meng K, Zhao L, Du L, Liu Q *et al* (2010). Hypoxia activates heparanase expression in an NF-kappaB dependent manner. *Oncology reports* **23**: 255-261.

Xiao GH, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsuuchi Y, Vande Woude GF, Testa JR (2001). Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 247-252.

Xie Q, Bradley R, Kang L, Koeman J, Ascierto ML, Worschech A *et al* (2012). Hepatocyte growth factor (HGF) autocrine activation predicts sensitivity to MET inhibition in glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 570-575.

Xu L, Nilsson MB, Saintigny P, Cascone T, Herynk MH, Du Z *et al* (2010). Epidermal growth factor receptor regulates MET levels and invasiveness through hypoxia-inducible factor-1alpha in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* **29**: 2616-2627.

Xu Y, Zhou J, Carey TE, McHugh JB, Voorhees JJ, Fisher GJ (2012). Receptor-type Protein tyrosine phosphatase beta regulates met phosphorylation and function in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* **14**: 1015-1022.

Yamada T, Matsumoto K, Wang W, Li Q, Nishioka Y, Sekido Y *et al* (2010). Hepatocyte growth factor reduces susceptibility to an irreversible epidermal growth factor receptor inhibitor in EGFR-T790M mutant lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**: 174-183.

Yamashita J, Ogawa M, Yamashita S, Nomura K, Kuramoto M, Saishoji T *et al* (1994). Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. *Cancer research* **54**: 1630-1633.

Yang SL, Wu C, Xiong ZF, Fang X (2015). Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). *Molecular medicine reports* **12**: 2411-2416.

Yano S, Wang W, Li Q, Matsumoto K, Sakurama H, Nakamura T *et al* (2008). Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer research* **68**: 9479-9487.

Yano S, Yamada T, Takeuchi S, Tachibana K, Minami Y, Yatabe Y *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. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **6**: 2011-2017.

Yarden Y, Sliwkowski MX (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell biology* **2**: 127-137.

Yo Y, Morishita R, Nakamura S, Tomita N, Yamamoto K, Moriguchi A *et al* (1998). Potential role of hepatocyte growth factor in the maintenance of renal structure: anti-apoptotic action of HGF on epithelial cells. *Kidney international* **54**: 1128-1138.

Yokoi K, Fidler IJ (2004). Hypoxia increases resistance of human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by gemcitabine. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**: 2299-2306.

You WK, Sennino B, Williamson CW, Falcon B, Hashizume H, Yao LC *et al* (2011). VEGF and c-Met blockade amplify angiogenesis inhibition in pancreatic islet cancer. *Cancer research* **71**: 4758-4768.

Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS (2001). HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 9630-9635.

Yun CH, Boggon TJ, Li Y, Woo MS, Greulich H, Meyerson M *et al* (2007). Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer cell* **11**: 217-227.

Zeng ZS, Weiser MR, Kuntz E, Chen CT, Khan SA, Forslund A *et al* (2008). c-Met gene amplification is associated with advanced stage colorectal cancer and liver metastases. *Cancer letters* **265**: 258-269.

Zhang Y, Schiff D, Park D, Abounader R (2014). MicroRNA-608 and microRNA-34a regulate chordoma malignancy by targeting EGFR, Bcl-xL and MET. *PloS one* **9**: e91546.

Zhou MM, Ravichandran KS, Olejniczak EF, Petros AM, Meadows RP, Sattler M *et al* (1995). Structure and ligand recognition of the phosphotyrosine binding domain of Shc. *Nature* **378**: 584-592.

Zhu H, Naujokas MA, Fixman ED, Torossian K, Park M (1994). Tyrosine 1356 in the carboxyl-terminal tail of the HGF/SF receptor is essential for the transduction of signals for cell motility and morphogenesis. *The Journal of biological chemistry* **269**: 29943-29948.

Annexes

Acquis universitaires :

- Thèse de Doctorat en Pharmacie et Diplôme d'Etudes Spécialisées - Filière Innovation Pharmaceutique et Recherche. Titre: Rôle de l'hypoxie et de l'héparanase dans la signalisation HGF/SF-MET.
- DUEC Pharmacie clinique oncologique (2013-2014)
- DIU du CESAM (Centre d'Enseignement de la Statistique Appliquée à la Médecine et à la Biologie Médicale), modules : Méthodologie statistique et Statistique en Biologie (2012-2013)
- Participation à la rédaction de mon article sur mes résultats de Master 2 Recherche avec publication dans Journal of AIDS and Clinical Research : Mekki MS, Liabeuf S, Paccou J, Izet T, Renard C, et al. (2014) Abdominal Aortic Calcification in Patient's Infected by the Human Immunodeficiency Virus. J AIDS Clin Res 5:351.

Formations de l'Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille :

- Communication scientifique et professionnelle en anglais (30h).
- Conférences de juin (4 demi-journées) :
 - Le métier d'enseignant chercheur
 - Les réseaux sociaux professionnels : comment en faire bon usage ?
 - Les pôles de compétitivité: des labos, des entreprises, des jeunes chercheurs
 - La création d'entreprise par les docteurs.
- Initiation à Zotéro : gérer sa documentation et rédiger sa bibliographie avec Zotéro (2h).
- Améliorer ses chances d'être publié : Pourquoi ? Comment ? (Une demi-journée)
- Formation logiciel R (3 jours)
- Formation vidéomicroscopie et microscopie confocale (3 jours)
- Formation en cytométrie en flux (FACS) (Une demi-journée)

- Bien utiliser les indicateurs bibliométriques en biologie santé (facteur d'impact, H-index, SIGAPS). (2h)

Congrès :

- *Communications orales :*
 - Conséquences de l'hypoxie sur la régulation de la signalisation du récepteur tyrosine kinase MET. 2^{ème} journées du SIRIC OncoLille. Lille (France, Juin 2015).
 - Role of hypoxia in the HGF/SF-MET signaling. 15^{ème} congrès du Groupe de Pharmacologie Oncologique Clinique (GPCO). Besançon (France, Décembre 2014).
 - Role of hypoxia, acidic microenvironment and heparanase in the regulation of HGF/SF-MET signaling. Journées des doctorants travaillant en Cancérologie Expérimentale et Clinique. Lille (France, Juin 2014).
 - Implication de la signalisation HGF-SF/MET, de l'héparanase et de l'hypoxie dans la résistance tumorale acquise. Journées scientifiques de l'UMR 8161, IBL. Lille (France, Mai 2013).
- *Communications affichées :*
 - Mekki MS, Copin MC, Paquet C, Leroy C, Melnyk O, Bonte JP, Vicogne J et Tulasne D. Conséquences de l'hypoxie sur la régulation de la signalisation HGF/SF-MET. 8^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest. Deauville (France, Juin 2015).
 - Mekki MS, Paquet C, Melnyk O, Bonte JP, Vicogne J et Tulasne D. Rôle de l'hypoxie dans la régulation de la signalisation HGF/SF-MET. 15^{ème} congrès du GPCO. Besançon (France, Décembre 2014).
 - Mekki MS, Paquet C, Melnyk O, Bonte JP and Vicogne J. Role of hypoxia, acidic microenvironment and heparanase in the regulation of HGF/SF-MET signaling. Journée Scientifique André Verbert. Lille (France, Septembre 2014).
 - Mekki MS, Paquet C, Melnyk O, Bonte JP and Vicogne J. Role of hypoxia, acidic microenvironment and heparanase in the regulation of HGF/SF-MET signaling.

Young Researchers in Life Science (YRLS) Conference 2014. Paris (France, Mai 2014).

- Mekki MS, Paquet C, Melnyk O, Bonte JP et Vicogne J. Rôle de l'hypoxie, du microenvironnement acide et de l'héparanase dans la régulation de la signalisation HGF/SF-MET. 7^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest. Deauville (France, Mai 2014).
- Mekki MS, Paquet C, Melnyk O, Bonte JP and Vicogne J. Role of hypoxia, acidic microenvironment and heparanase in the regulation of HGF/SF-MET signaling. EMBO/EMBL Symposium : Tumour Microenvironment and Signalling. Heidelberg (Allemagne, Mai 2014)
- Mekki MS, Melnyk O, Bonte JP and Vicogne J. Role of HGF/SF-MET signaling and hypoxia in tumor survival. 15th EMBL PhD Symposium. European Molecular Biology Laboratory. Heidelberg (Allemagne, Oct 2013)

Vulgarisation scientifique :

- Participation à la compétition internationale de communications pour la vulgarisation scientifique « FameLab » avec l'obtention du 2^{ème} prix du concours régional.
- Membre actif de l'association des docteurs et doctorants de Biologie Santé du Nord « Bioaddoct » avec organisation et participation à des évènements de vulgarisation scientifique.