

THÈSE

En vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Lille 2 Droit et Santé
École doctorale biologie – santé

Discipline : physiologie, physiopathologie, biologie systémique médicale
Spécialité : Biologie

Conséquences de la dérégulation de MET sur le phénotype des cancers bronchiques non à petites cellules EGFR mutés devenus résistants aux inhibiteurs de tyrosine kinase d'EGFR

Simon Baldacci

Soutenue le 12/12/2017

Sous la direction de : M. le Pr Alexis Cortot
Co-encadrante : Mme le Dr Zoulika Kherrouche

Jury :
M. le Pr Gérard Zalcman
Mme. le Pr Marie Wislez
M. le Dr Yvan De Launoit
Mme. le Pr Michèle Beau-Faller (rapporteur)
M. le Dr Luca Grumolato (rapporteur)

Conséquences de la dérégulation de MET sur le phénotype des cancers bronchiques non à petites cellules EGFR mutés devenus résistants aux inhibiteurs de tyrosine kinase d'EGFR

Résumé :

Introduction : Le traitement des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) EGFR mutés repose sur les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) du récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGFR). Cependant tous les patients traités par ITK EGFR finissent par présenter une progression tumorale, du fait de mécanismes de résistance comme l'amplification du gène codant pour le récepteur tyrosine kinase MET. Il n'existe actuellement aucune donnée sur les modifications phénotypiques induites par l'activation de MET dans ce contexte. L'objectif de cette thèse est de déterminer si l'amplification de *MET*, lors de la résistance aux ITK EGFR dans les CBNPC EGFR mutés, confère aux cellules tumorales un phénotype plus agressif et modifie l'histoire naturelle de la maladie.

Méthodes : Les capacités de prolifération, de croissance sans ancrage, de formation de sphéroïdes, de résistance à l'anoïkis et de migration ont été étudiées *in vitro* dans la lignée HCC827, dérivée d'un CBNPC EGFR muté, et dans sa lignée fille HCC827-GR6 (GR6) devenue résistante aux ITK EGFR *via* une amplification du gène *MET*. L'expression de la vimentine, de ZEB1, et de la E-cadherine a également été étudiée dans les deux lignées cellulaires afin d'évaluer l'impact de l'amplification de MET sur la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). *In vivo* la croissance tumorale et le potentiel métastatique ont respectivement été analysés dans des modèles murins de xélogreffe ectopique et d'injection intracardiaque. Enfin les données cliniques de patients issus de 15 centres avec un CBNPC EGFR muté métastatique, présentant une forte surexpression de MET en immunohistochimie (score 3+) ou une amplification de *MET* en FISH sur une re-biopsie réalisée après la progression sous ITK EGFR ont été analysées rétrospectivement.

Résultats : *In vitro*, l'amplification de *MET* induisait une augmentation significative de la prolifération, de la croissance sans ancrage, de la formation de sphéroïdes, de la résistance à l'anoïkis et de la migration. En présence d'un inhibiteur de MET, le PHA-665752, ces différentes propriétés biologiques étaient réduites de façon significative dans les cellules GR6 porteuses de l'amplification de *MET*. Il était également mis en évidence dans les cellules GR6 une augmentation de l'expression de la vimentine et de ZEB1. *In vivo*, l'amplification de *MET* augmentait significativement la croissance tumorale et le potentiel métastatique. Un traitement par crizotinib, ITK ciblant MET, diminuait de façon significative le potentiel métastatique des cellules porteuses de l'amplification de *MET*. Enfin les patients atteints d'un CBNPC EGFR muté, porteur d'une amplification de *MET* à la résistance à l'ITK EGFR, présentaient une durée jusqu'à apparition de nouvelles métastases plus courte après progression sous ITK EGFR que les patients avec une forte surexpression de MET sans amplification génique.

Conclusion

L'amplification de *MET* dans un contexte de résistance aux ITK EGFR est associée à un phénotype tumoral plus agressif. Ces résultats plaident en faveur d'une utilisation précoce d'inhibiteurs de MET en association avec les ITK EGFR afin d'éviter l'émergence d'un clone tumoral résistant plus agressif.

Mots clefs : EGFR, MET, inhibiteur de tyrosine kinase, cancer bronchique non à petites cellules

Consequences of MET dysregulation during EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor resistance in EGFR mutated Non-Small Cell Lung Cancers

Abstract :

Introduction: Treatment of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutated non-small cell lung cancers (NSCLC) relies on EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKI). However, all patients treated with EGFR TKI eventually present tumor progression, due to mechanisms of resistance such as the *MET* amplification. There is currently no data on phenotypic changes induced by *MET* activation in this context. The objective of this thesis is to determine whether the *MET* amplification during EGFR TKI resistance in the EGFR mutated NSCLC induces a more aggressive phenotype in tumor cells and alters the natural history of the disease.

Methods: Proliferation, anchorage independent growth, spheroid formation, anoikis resistance and migration were studied *in vitro* in the HCC827 cell line, derived from an EGFR mutated NSCLC, and in its daughter cell line HCC827-GR6 (GR6) which became resistant to EGFR TKI through *MET* amplification. The expression of vimentin, ZEB1, and E-cadherin was evaluated in these cellular models in order to investigate an epithelial to mesenchymal transition (EMT) process induced by the *MET* amplification. *In vivo*, the tumor growth and the metastatic potential were analyzed by subcutaneous xenograft and intracardiac injection in mouse models. Finally, the clinical data of patients from 15 centers with a metastatic EGFR mutated NSCLC, exhibiting high *MET* overexpression in immunohistochemistry (score 3+) or *MET* amplification assessed by FISH on a re-biopsy performed after TKI EGFR progression were analyzed retrospectively.

Results: *In vitro*, the *MET* amplification induced a significant increase in proliferation, anchorage independent growth, spheroid formation, anoikis resistance and migration. Treatment with PHA-665752, a *MET* TKI, significantly reduced these biological properties in the GR6 cells harboring the *MET* amplification. An increase in the expression of vimentin and ZEB1 was also observed in the GR6 cells. *In vivo*, the *MET* amplification significantly increased the tumor growth and the metastatic potential. Treatment with crizotinib, another *MET* TKI, significantly decreased the metastatic potential of cells carrying *MET* amplification. Finally, patients with an EGFR mutated NSCLC, displayed a time to new metastases after TKI EGFR progression shorter than patients with high *MET* overexpression without *MET* amplification.

Conclusion: The *MET* amplification during EGFR TKI resistance is associated in EGFR muted NSCLC with a more aggressive tumor phenotype. These results argue for the early use of *MET* inhibitors in combination with EGFR TKIs to avoid the emergence of a more aggressive resistant tumor clone.

Key Words : EGFR, *MET*, tyrosine kinase inhibitor, non small cell lung cancer

REMERCIEMENTS

Au Pr Gérard Zalcman et au Pr Marie Wislez, pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer mes travaux en participant à mon jury de thèse. Je remercie sincèrement le Pr Michèle Beau-Faller et le Dr Luca Grumolato d'avoir accepté d'être mes rapporteurs.

Au Dr Yvan de Launoit, pour son accueil bienveillant au sein de l'UMR8161 et sa participation à mon jury de thèse.

Au Pr Alexis Cortot, pour m'avoir fait confiance, pour m'avoir donné la chance de participer à cette aventure, et pour m'avoir dirigé avec finesse, rigueur et humanité.

Au Dr Zoulika Kherrouche, pour m'avoir accueilli et formé, pour la sincérité de son engagement scientifique, et pour son obstination contagieuse.

Alexis et Zou, nous sommes maintenant quelques-uns à avoir profité de votre enseignement. J'espère que nombreux seront ceux qui continueront à bénéficier de ce compagnonnage. Ces années ont été pour moi un tournant fondamental tant sur le plan personnel que professionnel, je veux vous témoigner toute ma gratitude et toute mon amitié.

Au Dr David Tulasne pour ses conseils avisés et cette équipe dont l'ambiance m'a donné envie de retrouver mes cellules chaque matin.

Au Pr Marie-Christine Copin pour sa patience et sa pédagogie. J'ai apprécié ces précieux échanges.

Aux membres, anciens et actuels, de l'équipe signal pour avoir partagé, entre joie et galère, les montagnes russes de la recherche : Catherine, Alessandro, Priscilla, Samira, Fabrice, Marie, Leslie, Hana, Jie Shuang, Elisabeth, Audrey.

A Eric Wasielewski pour son humour et son aide précieuse face aux méandres administratifs et méthodologiques.

A Maéva Kyheng pour ses remarques statistiques aussi judicieuses que réactives.

Au Pr Benoît WALLAERT qui a su gérer avec tact mon retour à la clinique.

A mes co-internes de l'hôpital de jour Vincent Durand, Diane Pelletier de Chambure et Margot Badelon pour leur gentillesse et leur indulgence.

A Nathalie Marchand pour toutes ces histoires vécues à l'animalerie et ses environs. J'ai toujours beaucoup de plaisir à repenser à ces souvenirs plus ou moins racontables.

A Vincent Cockenpot et Luc Stoven, pour leur importante participation à ce travail et à ses « à côté », j'espère vraiment que l'on retravaillera ensemble.

A Philippe Jamme qui a brillamment pris la relève, et à qui je souhaite le meilleur pour la suite. Je suis très fier de t'avoir eu comme kohai.

A Nadim et Manu, alors et vous ?

A Anne et à Marc-Antoine.

A mes parents, mon frère et ma soeur.

A Marie-Flore, Léonard, et maintenant Adèle.

PUBLICATIONS EN LIEN AVEC LES TRAVAUX DE THÈSE

Publications :

Outcome of EGFR-mutated NSCLC patients with MET-driven resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. Oncotarget (sous-presse).

Baldacci S, Mazieres J, Tomasini P, Girard N, Guisier F, Audigier Valette C, Monnet I, Wislez M, Pérol M, Dô P, Dansin E, Leduc C, Giroux Leprieur E, Moro-Sibilot D, Tulasne D, Kherrouche Z, Labreuche J, Cortot AB.

Resistance through MET amplification in EGFR mutated NSCLC promotes epithelium to mesenchyme transition and metastasis. JNCI (soumis).

Baldacci S, Kherrouche Z, Cockenpot V, Stoven L, Copin MC, Werkmeister E, Marchand N, Kyheng M, Tulasne D, Cortot AB.

Les mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de MET. La revue des maladies respiratoires, (en révision).

Baldacci S, Kherrouche Z, Descarpentries C, Wislez M, Dansin E, Furlan A, Tulasne D, Cortot AB.

Communications :

Poster : World Conference on Lung Cancer (Vienne 07/12/16) : P3.02b-051 *Outcome of Advanced EGFR-Mutated NSCLC Patients with MET-Driven Acquired Resistance to EGFR TKI. Results of the METEORE Study.* DOI:10.1016/j.jtho.2016.11.1718

Baldacci S, Mazieres J, Tomasini P, Girard N, Guisier F, Audigier Valette C, Monnet I, Wislez M, Pérol M, Dô P, Dansin E, Leduc C, Giroux Leprieur E, Moro-Sibilot D, Kherrouche Z, Labreuche J, Cortot A B

Communication Orale : European Respiratory Society (Amsterdam 30/09/15) : *Met amplification induces an aggressive phenotype in EGFR tyrosine kinase inhibitors resistant non-small-cell lung cancer.* European Respiratory Journal 09/2015; 46 (suppl 59). DOI:10.1183/13993003.congress-2015.OA4981

Baldacci S, Kherrouche Z, Stoven L, Werkmeister E, Marchand N, Tulasne D, Cortot A B (*participation à pneumopulse 2015*)

Communication Orale : Société Française du Cancer (Paris 25/06/2015) : *Amplification of MET is associated with a more aggressive phenotype in the resistance to EGFR inhibitors in lung cancer non-small cell.* Bulletin du cancer 06/2015; 102(6).

Baldacci S, Kherrouche Z, Stoven L, Werkmeister E, Marchand N, Tulasne D, Cortot A B

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	8
ABRÉVIATIONS	9
Liste des Figures et des Tableaux	11
INTRODUCTION	12
I. La voie MET	13
1) Découverte et structure du récepteur MET	13
2) Découverte et structure du ligand de MET : l'HGF	16
3) La signalisation du récepteur MET	17
a. L'activation de MET par l'HGF	17
b. Les voies de signalisation en aval du récepteur	17
4) Les réponses biologiques induites par MET	21
a. La dispersion et la morphogenèse de branchement.....	21
b. La prolifération et la résistance à l'apoptose	22
5) Rôle physiologique de MET	23
6) La régulation de la signalisation de MET	24
a. Les relais de signalisation membranaires	24
b. Internalisation, trafic et dégradation du récepteur MET	28
c. Les phosphatases.....	29
d. La sérine 985	30
7) Les dérégulations de MET dans le cancer	30
a. La surexpression de MET.....	30
b. La sécrétion d'HGF	33
c. L'amplification de MET	33
d. Les mutations de MET	35
e. Les fusions de MET	37
II. MET et les cancers bronchiques non à petites cellules EGFR muté	38
1) Epidémiologie des cancers pulmonaires.....	38
2) L'EGFR et la découverte de ses mutations dans les cancers bronchiques non à petites cellules	39
3) Caractéristiques cliniques des cancers bronchiques non à petites cellules EGFR mutés	41
4) Traitement des cancers bronchiques non à petites cellules EGFR mutés métastatiques	41
5) Résistance aux ITK EGFR : mécanismes et traitement	43
6) Le récepteur MET dans la résistance aux inhibiteurs d'EGFR.....	45
III. Objectifs.....	47
TRAVAUX PERSONNELS.....	48
DISCUSSION.....	142

ABRÉVIATIONS

ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AKT : AKT8 virus oncogene cellular homolog

ALK : Anaplastic Lymphoma Kinase

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AP1 : Activated Protein 1

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

BIM : BisIndolylMaleimide

BRAF : b-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

CBNPC : Cancer Bronchique Non à Petites Cellules

CBPC : Cancer Bronchique à Petites Cellules

CD44 : Cluster of Differentiation 44

CGH : Comparative Genomic Hybridization

CLIP2 : CAP-Gly domain Containing Linker Protein 2

COX-2 : CycloOxygenase 2

CRKL : CT regulator kinase like-proto oncogene

DISC : Death Inducing Signaling Complex

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EGF : Epidermal Growth Factor

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

ERK : Extracellular signal Regulated Kinase

ETS-1 : Avian Erythroblastosis Virus E26 homolog-1

FAK : Focal Adhesion kinase

FAS : Fibroblast Associated

FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

GAB1 : GRB2-associated binder 1

GRB2 : Growth factor receptor –bound protein 2

HER : Human Epidermal growth factor Receptor

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HIF : Hypoxia Inducible Factor

HRS : HGF Regulated tyrosine kinase Substrate

IHC : Immunohistochimie

IPT : Immunoglobulin-like region in Plexin and Transcription factors

ITK : Inhibiteur de Tyrosine Kinase

KO : Knock Out

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

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MBD : **MET binding domain**

MDM2 : Murine Double Minute 2

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

Myc : Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog

NF-KB : Nuclear Factor κ B

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDX : Patient Derived Xenograft

PH : Pleckstrin homology domain

PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase

PIP₂ (4, 5) : Phosphatidyl Inositol (4, 5) biPhosphate

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

PKC : Protein kinase C

PLC γ : Phospholipase C γ

PPA2 : Protein phosphatase 2

PSI : Plexin Semaphorin Intergrin

PTB : PhosphoTyrosine Binding

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

RAC1 : RAs-related C3 botulinum toxin substrate 1

RAS : RAt Sarcoma

RECIST : Response Evaluation Criteria In Solid Tumors

RON : Récepteur d'Origine Nantais

RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

SH2/3: Src Homology 2/3

SHC : SH2 domain containing transforming protein

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

ShRNA : Short Hairpin RiboNucleotic Acid

SOS : Son of Sevenless

SPH : Serine Proteinase Homology

SRC : SaRCome proto-oncogene

SSP : Survie sans progression

STAT 3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

TGF- α : Transforming Growth Factor α

TPR : Translocated Promoter Region

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor

Liste des Figures et des Tableaux

Figure 1 : Représentation des 20 sous familles de récepteurs tyrosine kinase et de leurs principaux domaines fonctionnels (Lemmon and Schlessinger 2010).

Figure 2 : Représentation des principaux domaines fonctionnels du récepteur MET.

Figure 3 : Structure de l'Hepatocyte Growth Factor (HGF).

Figure 4 : Les voies de signalisation intracellulaires activées par MET (C. R. Graveel, Tolbert, and Vande Woude 2013).

Figure 5 : Score d'expression tumorale de MET en immunohistochimie avec l'anticorps monoclonal SP44 (Montagne *et al.* 2015).

Figure 6 : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels de l'EGFR (adapté de (Lemmon, Schlessinger, and Ferguson 2014)).

Tableau 1 : Résultats des essais de phase 3 comparant la chimiothérapie aux ITK EGFR en première ligne (adapté de (Cortot and Jänne 2014)).

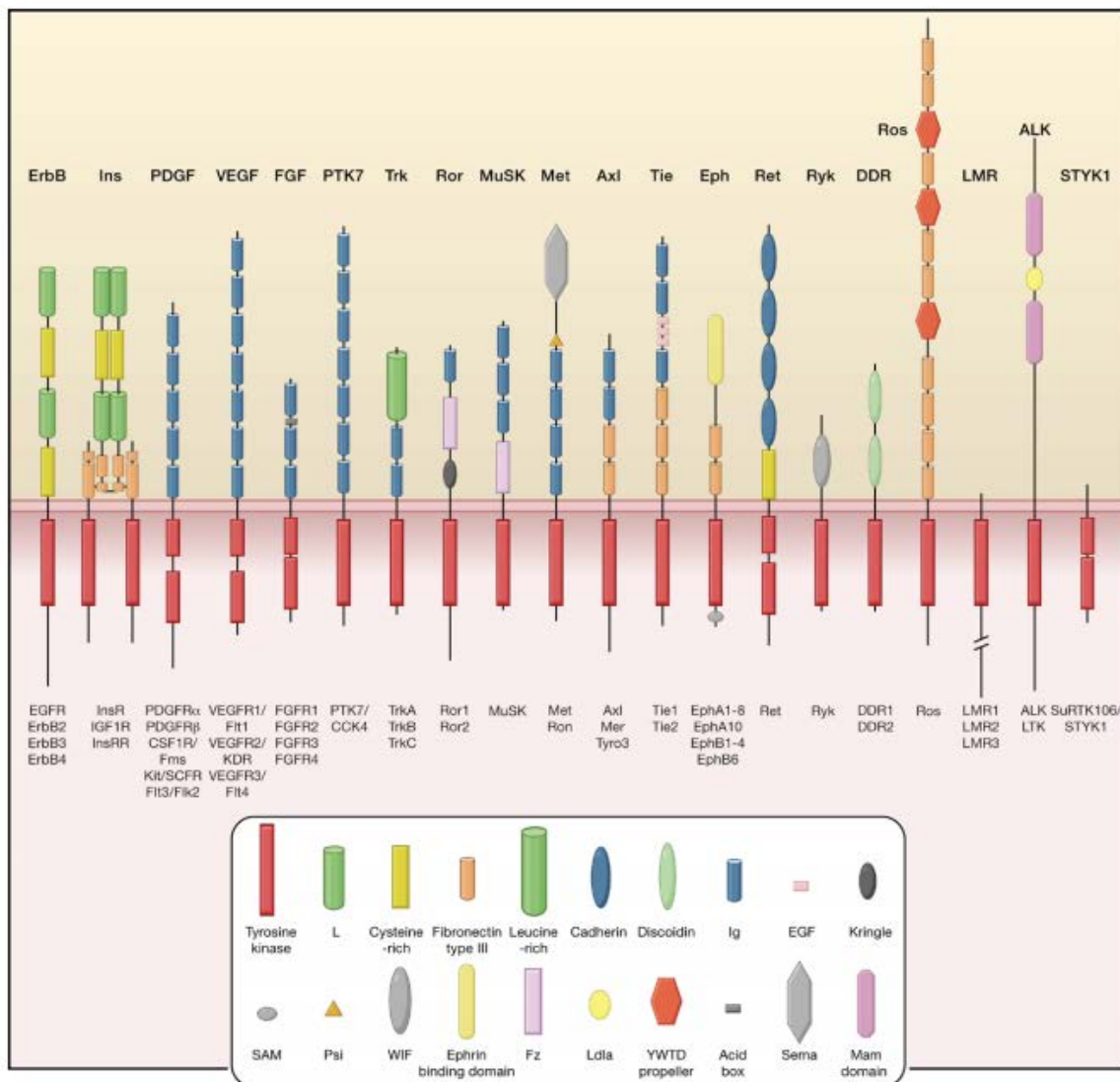
Tableau 2 : Etudes évaluant la fréquence de l'amplification de *MET* lors la résistance aux ITK EGFR dans les CBNPC EGFR mutés.

Tableau 3 : Liste des essais en cours testant un inhibiteur de MET en association à un inhibiteur d'EGFR dans les CBNPC EGFR mutés.

INTRODUCTION

La phosphorylation est une modification post traductionnelle réversible définie par le transfert d'un groupement phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP) vers un résidu sérine, thréonine ou tyrosine. Ce processus contrôle l'activité biologique de multiples protéines au sein de la cellule. La réaction de phosphorylation est catalysée par une classe d'enzymes appelées kinases. Chez l'homme, plus de 520 kinases ont été identifiées et environ 90 correspondent à des tyrosine kinases (Blume-Jensen and Hunter 2001; Robinson, Wu, and Lin 2000). Les récepteurs tyrosine kinase (RTK) constituent une sous classe de 58 tyrosine kinases divisée en 20 sous familles impliquées dans la transmission de signaux intercellulaires. Ces protéines partagent toutes une structure de base similaire comprenant : un domaine extracellulaire de fixation au ligand, un domaine transmembranaire constitué d'une seule hélice, et un domaine intracellulaire C-terminal porteur de l'activité kinase (Lemmon and Schlessinger 2010). L'activation des RTK est un phénomène complexe hautement régulé. En effet en l'absence de ligand, l'activité catalytique des RTK est inhibée par des interactions intramoléculaires (Schlessinger 2000). La fixation spécifique du ligand sur un RTK induit généralement sa dimérisation et engendre des modifications conformationnelles responsables de la trans-autophosphorylation de plusieurs de ses résidus tyrosines. Ceci conduit à une activation de son domaine catalytique (Heldin 1995). Plusieurs protéines de signalisation capables de reconnaître les tyrosines phosphorylées des RTK sont alors recrutées. Elles sont à leur tour phosphorylées et activées par le RTK conduisant ainsi à des cascades de signalisation intracellulaire impliquées dans divers processus biologiques tels que la prolifération, la survie, la différenciation, l'apoptose, l'autophagie ou la migration. La dérégulation de l'activité des RTK est à l'origine de nombreuses pathologies humaines dont les cancers (McDonnell *et al.* 2015). Les RTK constituent en conséquence des cibles thérapeutiques majeures et de nombreuses molécules ont été développées ou sont en cours de développement afin d'inhiber leur activité.

Figure 1 : Représentation des 20 sous familles de récepteurs tyrosine kinase et de leurs principaux domaines fonctionnels (Lemmon and Schlessinger 2010).



I. La voie MET

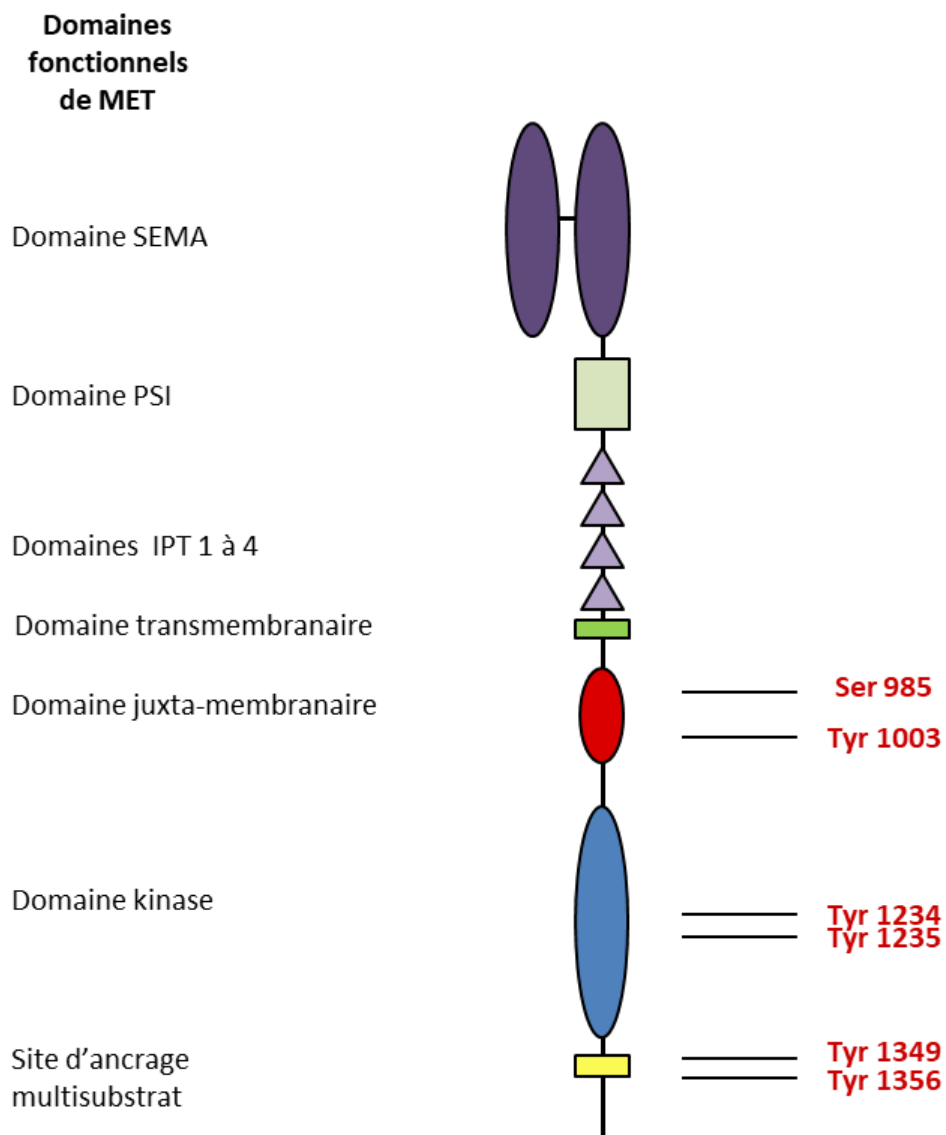
1) Découverte et structure du récepteur MET

MET est un récepteur tyrosine kinase dont le gène a été identifié il y a plus de 30 ans à partir d'une lignée humaine d'ostéosarcome exposée à un carcinogène chimique le N-méthyl-N'-nitroso-guaninidine (Cooper *et al.* 1984). Dans ce modèle, une translocation entre le chromosome 1 et le chromosome 7 entraîne la formation d'une protéine de fusion

oncogénique TPR-MET constituée du domaine de dimérisation de la nucléoporine TPR (Translocated Promoter Region) et du domaine kinase de MET (M. Park *et al.* 1986). La dimérisation induite par la partie TPR, provoque l'activation constitutive de la kinase de la partie MET. L'identification de la séquence codante complète de *MET* a permis par la suite de déterminer qu'il s'agissait d'un gène responsable de la synthèse d'un récepteur tyrosine kinase (M. Park *et al.* 1987; S. Giordano *et al.* 1989). Ce gène, situé sur le bras long du chromosome 7 (7q31), s'étend sur environ 126 kb et comprend 21 exons et 20 introns. Il code pour un ARN messager de 8 kb dont la traduction permet la synthèse d'une protéine immature de 170 kDa (Lin *et al.* 1998). Un épissage alternatif permet également la production d'une forme minoritaire du récepteur comprenant 18 acides aminés supplémentaires dans le domaine extracellulaire (G. A. Rodrigues, Naujokas, and Park 1991). Le précurseur protéique majoritaire subit ensuite un clivage par la furine entre la lysine 307 et l'arginine 308 produisant ainsi une sous unité α de 50 kDa et une sous unité β de 145 kDa (Komada *et al.* 1993). Les sous unités α et β , reliées entre elles par un pont disulfure, constituent le récepteur MET mature (Tempest, Stratton, and Cooper 1988).

Le domaine extracellulaire de MET comprend un domaine SEMA N-terminal englobant la sous unité α ainsi que les premiers acides aminés de la sous unité β , suivi d'un domaine PSI (Plexin Semaphorin Intergin) riche en cystéines et de 4 domaines homologues aux immunoglobulines IPT (Immunoglobulin-like region in Plexin and Transcription factors). La structure tridimensionnelle du domaine extracellulaire a été caractérisée en 2003. Elle montre que le domaine SEMA, qui partage une forte homologie avec d'autres protéines de signalisation telles que les sémaphorines et les plexines, s'organise de façon globulaire en 7 feuillets beta. Le domaine SEMA est ensuite suivi d'une tige formée par les domaines PSI et IPT (Gherardi *et al.* 2003). La partie extracellulaire du récepteur est ensuite reliée par une unique hélice transmembranaire à son domaine intracellulaire. Ce dernier est formé d'une région juxtamembranaire régulatrice, du domaine tyrosine kinase et d'une queue C-terminale nécessaire au recrutement de protéines de signalisation d'aval (Schiering *et al.* 2003). L'ensemble de cette structure est également partagé par le récepteur tyrosine kinase RON (Récepteur d'origine nantais)(Ronsin *et al.* 1993).

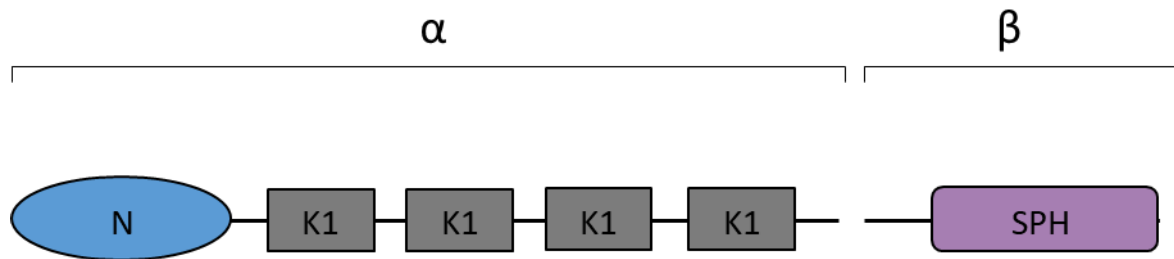
Figure 2 : Représentation des principaux domaines fonctionnels du récepteur MET : le domaine SEMA ■, le domaine plexine-semaphorine-intergrine (PSI) ■, les quatre domaines IPT (Immonoglobulin-like region in Plexin and Transcription factors) ▲, le domaine transmembranaire ■, le domaine juxta-membranaire ■, le domaine kinase ■ et le site d'ancrage multi-substrat ■. Les résidus phosphorylables sont indiqués en rouge.



2) Découverte et structure du ligand de MET : l'HGF

Le ligand de haute affinité spécifique de MET est l'HGF (Hepatocyte Growth Factor). Cette protéine a été identifiée en 1984 à partir de séra de rats partiellement hépatectomisés, comme un facteur de croissance des hépatocytes *in vitro* (T. Nakamura, Nawa, and Ichihara 1984). Trois ans plus tard, une protéine induisant la dispersion des cellules épithéliales en culture est découverte et appelée Scatter Factor (Stoker *et al.* 1987). En 1991, Weider *et al.* démontrent que l'HGF et le Scatter Factor correspondent en réalité à une seule et même protéine codée par un seul et même gène (Weidner *et al.* 1991). La même année, plusieurs publications permettent d'établir que l'HGF est le ligand de haute affinité capable de lier et d'activer MET (Naldini, Vigna, *et al.* 1991; Naldini, Weidner, *et al.* 1991; Bottaro *et al.* 1991). Le gène codant pour l'HGF est situé sur le bras long du chromosome 7 (7q21). Il s'étend sur 70 kb et comprend 18 exons et 17 introns (Fukuyama *et al.* 1991; Seki *et al.* 1991). L'HGF est synthétisé sous forme d'un pro-HGF inactif structurellement apparenté à la famille des sérines protéases et en particulier au plasminogène ainsi qu'au Macrophage Stimulating Factor (MSP). La forme immature de l'HGF peut lier MET mais demeure incapable de l'activer (Lokker *et al.* 1992). Le pro-HGF est activé par clivage protéolytique sur un site tryptase like situé entre l'arginine 454 et la valine 495. Il est alors converti en un hétérodimère actif (Gak *et al.* 1992; Naldini *et al.* 1992). Plusieurs protéases sont capables d'activer l'HGF telles que l'urokinase type plasminogène activator (Mars, Zarnegar, and Michalopoulos 1993), la matriptase (S.-L. Lee *et al.* 2010), l'hépsine (Kirchhofer *et al.* 2005), l'hépatocyte growth factor activator (Shimomura *et al.* 1993), la plasma kallikrein (Peek *et al.* 2002) et le facteur de coagulation XIa (Shimomura *et al.* 1993). L'hétérodimère de 90 kDa formant l'HGF mature est constitué d'une sous-unité α de 69 kDa et d'une sous-unité β de 34 kDa reliées par un pont disulfure (T. Nakamura *et al.* 1987; Naka *et al.* 1992). La sous-unité α inclut un domaine N-terminal, aussi appelé domaine HL pour hairpin loop, relié à 4 domaines kringle (K1 à K4, correspondant à des boucles formées par des ponts disulfures intra-chaine) tandis que la sous-unité β est constituée d'un domaine SHP (serine protease homology) dépourvu d'activité catalytique (Donate *et al.* 1994).

Figure 3 : Structure de l'Hepatocyte Growth Factor (HGF). Le domaine N terminal et les 4 domaines Kringle (K1 à K4) constituent la sous unité α de l'HGF mature, et le domaine serine protease homology (SPH) la sous unité β .



3) La signalisation du récepteur MET

a. L'activation de MET par l'HGF

Aucune structure cristalline des chaînes α et β de l'HGF mature lié au récepteur MET n'a jusqu'à présent été réalisée. Cependant plusieurs sites de liaison entre l'HGF et MET ont été identifiés. Ainsi le domaine SEMA de MET est capable de reconnaître le domaine SHP de l'HGF mais cette seule interaction ne permet pas d'activer le récepteur (Stamos *et al.* 2004; Kirchhofer *et al.* 2004). La région comprenant les domaines N et K1 de l'HGF peut également fixer et activer MET *via* son domaine SEMA (Gherardi *et al.* 2006; Youles *et al.* 2008) ou *via* ses domaines IPT3 et 4 (Basilico *et al.* 2008). La fixation de l'HGF sur MET induit la dimérisation du récepteur et provoque l'autophosphorylation de deux résidus tyrosine situés sur la boucle d'activation du domaine catalytique de MET : Y1234 et Y1235 (Longati *et al.* 1994; Komada and Kitamura 1994). Ceci entraîne un changement conformationnel conduisant la phosphorylation d'autres résidus tyrosine situés en dehors du domaine catalytique, notamment la Y1003 au niveau du domaine juxtamembranaire ainsi que la Y1349 et la Y1356 au niveau C terminal (Ponzetto *et al.* 1994; Ferracini *et al.* 1991).

b. Les voies de signalisation en aval du récepteur

Le domaine C-terminal de MET correspond à un site d'ancrage multi-substrats comprenant les résidus tyrosine Y1349 et Y1356. La phosphorylation de ces résidus est un événement fondamental, nécessaire *in vitro* et *in vivo* au fonctionnement de la signalisation de MET (Maina *et al.* 1996; Ponzetto *et al.* 1994). En effet, l'autophosphorylation des

tyrosines Y1349 et Y1356 lors de l'activation de MET induit le recrutement de protéines adaptatrices et de protéines de signalisation effectrices porteuses d'un domaine SH2 (Src Homology 2) ou d'un domaine PTB (PhosphoTyrosine Binding) (Fournier *et al.* 1996; Royal and Park 1995; Ponzetto *et al.* 1994; Zhu *et al.* 1994). Les protéines adaptatrices sont dépourvues d'activité catalytique. Elles permettent le recrutement et l'activation de nombreuses protéines de signalisation effectrices contribuant ainsi à diversifier et à accentuer la signalisation induite par le récepteur (Brummer, Schmitz-Peiffer, and Daly 2010). Les principales protéines adaptatrices recrutées par MET sont :

- **GRB2 (Growth factor Receptor-Bound protein 2)** : GRB2 est un adaptateur protéique se fixant sur la tyrosine phosphorylée 1356 de MET *via* son domaine SH2 (Zhu *et al.* 1994; Ponzetto *et al.* 1994). Grâce à sa région d'homologie avec SRC3 (SH3), GRB2 est capable à son tour de recruter des protéines telles que SOS (Son of Sevenless), inducteur de la voie Ras/MAPK et GAB1 une autre molécule adaptatrice (Bardelli *et al.* 1997; L. S. Lock *et al.* 2000).
- **SHC** : SHC est un adaptateur protéique se fixant sur les tyrosines phosphorylées du site d'ancrage multisubstrat de MET *via* un domaine PTB (M. M. Zhou *et al.* 1995). SHC est ensuite phosphorylé sur l'une de ses tyrosines par MET générant un site de haute affinité pour GRB2 (Pelicci *et al.* 1995)
- **GAB1 (GRB2-associated-binding protein 1)** : GAB1 est une protéine adaptatrice qui peut être recrutée soit de manière indirecte par MET *via* GRB2, soit de manière directe *via* son domaine MDB (MET Binding Domain), capable de reconnaître la tyrosine 1349 phosphorylée de MET (Weidner *et al.* 1996; Schaeper *et al.* 2000; Lisa S. Lock *et al.* 2003). GAB1 possède de multiples résidus tyrosine dont la phosphorylation par MET, permet le recrutement de protéines porteuses d'un domaine SH2 ou d'un domaine PTB. En particulier, GAB1 contribue au recrutement de la PI3K *via* sa sous-unité p85 (Maroun *et al.* 1999), de la PLC γ (Gual *et al.* 2000), de SHP2 (Maroun *et al.* 2000), et de protéines adaptatrices comme NCK (Kochhar and Iyer 1996) et CRKL (Sakkab *et al.* 2000).

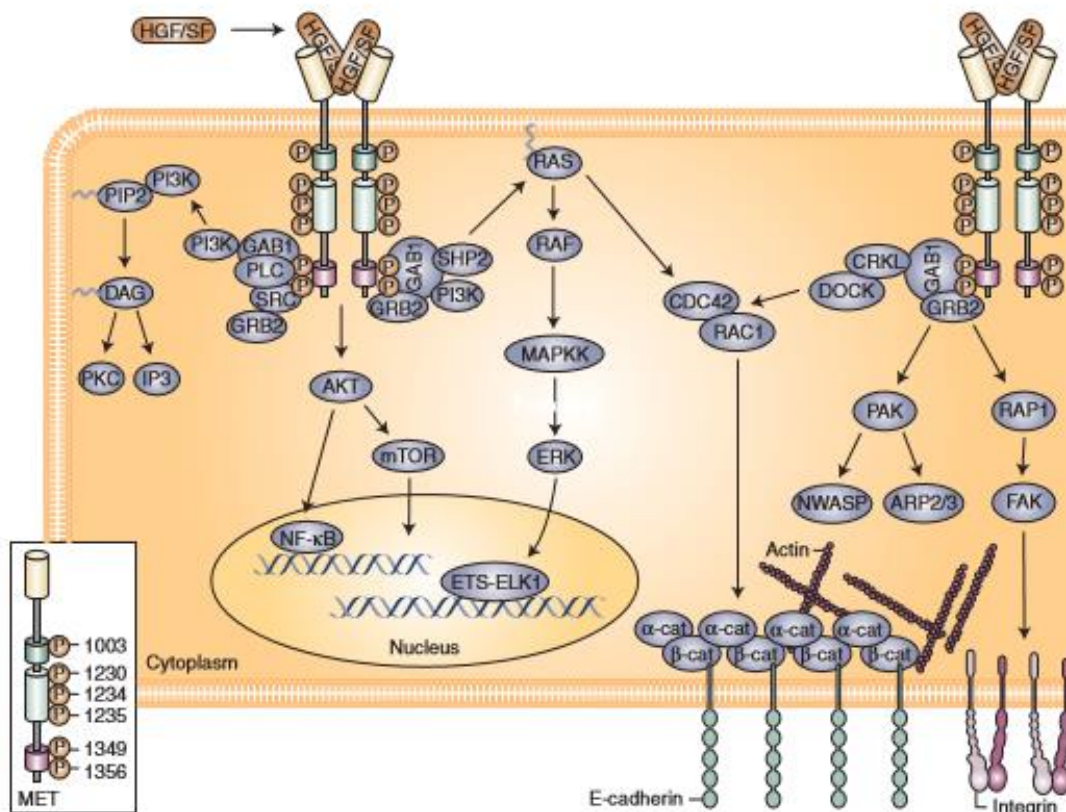
En recrutant soit directement, soit grâce à des adaptateurs protéiques, de nombreuses protéines de signalisation d'aval, MET est capable d'activer de nombreuses voies telles que :

- **La voie PI3K/AKT.** La PI3K peut s'associer à MET *via* sa sous unité p85 de manière directe au niveau de la tyrosine 1356 du site d'ancrage multi-substrats ou de manière indirecte *via* GAB1 (Ponzetto *et al.* 1994). Après son recrutement la PI3K est phosphorylée et activée (Graziani *et al.* 1991; Bardelli *et al.* 1992; Ponzetto *et al.* 1993). Elle catalyse alors la phosphorylation du PIP2 (phosphatidyl inositol (4,5) phosphate) en PIP3 (phosphatidyl inositol (3, 4, 5) tri-phosphate). Ceci conduit à l'activation de protéines présentant un domaine PH (Pleckstrin Homology) telle que la sérine thréonine kinase AKT. L'activation d'AKT entraîne la phosphorylation et l'inhibition de nombreuses protéines principalement pro-apoptotiques favorisant ainsi la survie cellulaire (Xiao *et al.* 2001). Plusieurs autres fonctions biologiques ont été associées avec la voie PI3K comme la mobilité (Royal and Park 1995), l'invasion (Trusolino *et al.* 2000), et la réorganisation du cytosquelette (Wells, Abo, and Ridley 2002). L'activité de la PI3K est cruciale pour le chimiotactisme, la tubulogénèse ainsi que pour la prolifération (Derman *et al.* 1995; Skouteris and Georgakopoulos 1996).
- **La voie Ras/MAPK.** Cette voie de signalisation est principalement activée par la fixation de GRB2 sur MET ou sur l'adaptateur SHC. En effet le recrutement de GRB2 provoque l'activation de l'échangeur guanidique SOS, qui, à son tour, active la protéine G membranaire Ras. Le recrutement de SHP2 par GAB1 permet également de favoriser l'activation de Ras (Maroun *et al.* 2000). L'activation de Ras déclenche alors la cascade des MAP kinases : Ras active RAF, qui phosphoryle MEK1 (MAP/ERK kinase 1), qui phosphoryle à son tour ERK (Extracellular Signal-Regulated kinase 1) (Ponzetto *et al.* 1994; N. Li *et al.* 1993). ERK active enfin différents facteurs transcriptionnels dont c-Fos, ETS-1. Lors de la réponse à l'HGF, la voie des MAPK est principalement impliquée dans la prolifération cellulaire et la morphogénèse (Tulasne *et al.* 2002; Schaeper *et al.* 2000; Maroun *et al.* 2000).
- **La voie STAT3.** STAT3 est recruté au niveau des tyrosines du site d'ancrage multi-substrats de MET *via* son domaine SH2. Il est à son tour phosphorylé sur ses tyrosines

et transloqué dans le noyau. Il permet d'induire un programme transcriptionnel nécessaire à la tubulogénèse (Boccaccio *et al.* 1998; Schaper *et al.* 1997). L'activation de STAT3 est par ailleurs requise pour la croissance sans ancrage et la tumorigénèse (Zhang *et al.* 2002).

- **La voie de la PLC γ (Phospholipase C γ).** La PLC γ est une phospholipase capable de s'associer directement à la tyrosine 1356 phosphorylée du site d'ancrage multi-substrats du récepteur MET activé. Elle peut également être recrutée indirectement par GAB1. Une fois phosphorylée et activée par MET, la PLC γ induit alors la synthèse d'IP3 (1, 4, 5, triphosphate) et de DG (1,2 diacylglycérol) (Bardelli *et al.* 1992). Ceci entraîne la libération de calcium, médiée par l'IP3, depuis les stocks intracellulaires (Kaneko *et al.* 1992). L'accumulation dans le cytosol de calcium et de DG conduit enfin à l'activation de la PKC (Protein Kinase C) qui participe à la prolifération en activant à son tour les MAP kinases p38 et ERK (Awasthi and King 2000).
- **La voie des protéines de la famille SRC.** Les kinases SRC (Rahimi *et al.* 1998) et FYN (Bardelli *et al.* 1992) sont capables de se lier directement sur les tyrosines phosphorylées du site d'ancrage multi-substrat de MET et d'être activées à la suite d'une stimulation du récepteur par l'HGF. La kinase SRC contribue à la phosphorylation de GAB1 et est essentielle à la mobilité (Chan *et al.* 2003). Elle phosphoryle et active également FAK (focal adhesion kinase) (T.-H. Chen *et al.* 2011). Une fois activée FAK peut recruter GRB2 et induire la voie des MAPK (H. C. Chen *et al.* 1998).
- **Les protéines adaptatrices de la famille CRK.** Les protéines adaptatrices CRK-II et CRKL peuvent se fixer sur GAB1 phosphorylé et induire l'activation des Rho GTPases Rac1 et Rap1 impliquées dans la mobilité et la dispersion cellulaire (Lamorte *et al.* 2002; Sakkab *et al.* 2000; S. P. Rodrigues *et al.* 2005).
- **Les phosphatases SHIP-1 et 2 (SH2 domain containing inositol 5 phosphatase 1 et 2).** Ces protéines fixent MET sur la Y1356 et stimulent la formation de lamellipodes ainsi que la tubulogénèse (Stefan *et al.* 2001; Koch *et al.* 2005).

Figure 4 : Les voies de signalisation intracellulaires activées par MET (C. R. Graveel, Tolbert, and Vande Woude 2013). Après son activation à la membrane plasmique par son ligand l'HGF, le récepteur MET est capable d'induire diverses voies de signalisation intracellulaire dont les voies PI3K/AKT, RAS/MAPK, ou CRKL/RAC1 impliquées dans plusieurs réponses biologiques comme la prolifération, la survie cellulaire ou la migration. Les adaptateurs protéiques GRB2 et GAB1 jouent un rôle crucial dans le recrutement et l'activation des différents acteurs de ces voies de signalisation.



4) Les réponses biologiques induites par MET

L'activation de MET induit un programme de croissance dite « invasive », associant des réponses biologiques au niveau cellulaire telles que la prolifération, la résistance à l'apoptose, la dispersion, la mobilité cellulaire et la morphogénèse de branchement (Comoglio and Trusolino 2002).

a. La dispersion et la morphogénèse de branchement

Les cellules d'origine épithéliale comme les MDCK (Madin-Darby canine kidney epithelial cells) croissent en culture bidimensionnelle sous forme d'une monocouche de cellules cubiques jointives. L'activation de MET par l'HGF induit dans ces cellules une

réorganisation du cytosquelette d'actine entraînant la formation de multiples bourgeonnements membranaires (Stoker and Perryman 1985; Stoker *et al.* 1987). Rapidement les complexes jonctionnels assurant l'adhésion intercellulaire sont perdus et les cellules se dispersent en prenant une morphologie allongée proche de celle des fibroblastes (Hay and Zuk 1995; Grisendi, Arpin, and Crepaldi 1998). Ce phénomène est dépendant de l'activation par MET, *via* les voies de signalisation Ras MAPK et PI3K, des Rho GTPase Rac1, RhoA, et Cdc42 (Royal and Park 1995; Potempa and Ridley 1998; Royal *et al.* 2000). La stimulation par l'HGF permet enfin de phosphoryler la paxilline et FAK augmentant ainsi les capacités migratoires des cellules (Z.-X. Liu *et al.* 2002; Matsumoto *et al.* 1994).

Lors d'une culture en 3 dimensions dans un gel riche en collagène, les cellules d'origine épithéliale s'organisent en structures kystiques. Une stimulation par l'HGF conduit ces kystes à former des réseaux tubulaires interconnectés (Brinkmann *et al.* 1995; Montesano *et al.* 1998). Ce processus, appelé morphogenèse de branchement, est dépendant de l'activation par MET des voies PI3K et MAPK ainsi que de l'activité des métalloprotéases responsables d'une dégradation de la matrice extracellulaire (O'Brien *et al.* 2004; W. Yu *et al.* 2003).

b. La prolifération et la résistance à l'apoptose

L'activation de MET est responsable d'une augmentation de la résistance à l'apoptose grâce à l'activation de la voie PI3K et dans une moindre mesure de la voie MAPK (Xiao *et al.* 2001; Zeng *et al.* 2002). En effet la voie PI3K/AKT entraîne la phosphorylation et l'inactivation de la protéine pro-apoptotique Bad et permet l'expression de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-xl et Mcl-1 (Y. Liu 1999; Schulze-Bergkamen *et al.* 2004). De plus la voie PI3K/AKT, *via* la protéine kinase mTOR, stimule la synthèse et le transport nucléaire de la protéine MDM2 responsable de l'inhibition de TP53 (Moumen *et al.* 2007).

Grâce à l'activation des voies PI3K et MAPK, MET favorise par ailleurs la prolifération cellulaire en induisant la synthèse de facteurs transcriptionnels tels que JUN, FOS, Myc ou NF- κ B qui permettent la progression dans le cycle cellulaire (de Juan *et al.* 1994; Gómez-Lechón *et al.* 1996; Takeuchi *et al.* 2001; Müller, Morotti, and Ponzetto 2002).

5) Rôle physiologique de MET

Durant les stades précoces du développement embryonnaire, l'HGF et MET sont exprimés de manière concomitante dans le mésoderme et l'ectoderme suggérant une activation de la voie HGF/MET sur un mode autocrine. A partir du début de l'organogenèse, l'expression de MET se restreint aux cellules épithéliales, aux myoblastes et aux précurseurs neuronaux tandis que l'HGF est principalement exprimé par le tissu mésenchymateux adjacent (Andermarcher, Surani, and Gherardi 1996; Sonnenberg *et al.* 1993). L'inactivation de *MET* ou de *HGF* chez la souris produit des phénotypes identiques se traduisant par un décès in utero au 15^e jour de développement du fait d'un défaut d'organisation du trophoblaste placentaire responsable d'une ischémie foetale (Uehara *et al.* 1995). Les souris *MET*^{-/-} et *HGF*^{-/-} présentent de plus un foie atrophique, ainsi qu'un défaut de formation des muscles squelettiques au niveau de la langue, du diaphragme et des membres en raison d'un blocage de la migration des précurseurs musculaires dans les somites (C. Schmidt *et al.* 1995; Bladt *et al.* 1995). L'inactivation conditionnelle de *MET* a par la suite permis de démontrer l'implication du récepteur dans la formation de différentes structures comme des alvéoles pulmonaires (Calvi *et al.* 2013), des néphrons (Ishibe *et al.* 2009), ou de certains muscles squelettiques (Prunotto *et al.* 2004). MET intervient également dans le développement du cortex, du cervelet ainsi que dans la prolifération et la différenciation des progéniteurs des oligodendrocytes (Smith, Xu, and Powell 2012; Ohya *et al.* 2007; Powell *et al.* 2003; Ieraci, Forni, and Ponzetto 2002). Cette implication de MET dans l'organisation du système nerveux central pourrait notamment expliquer l'association observée entre certaines mutations de *MET* et les troubles du spectre autistique (Campbell *et al.* 2008; Sousa *et al.* 2009).

Chez l'adulte, MET est principalement exprimé par les cellules épithéliales (Prat *et al.* 1991; Di Renzo *et al.* 1991), les cellules endothéliales (Bussolino *et al.* 1992), les progéniteurs hématopoïétiques (Nishino *et al.* 1995), les lymphocytes B (Taher *et al.* 2002) et les cellules cérébrales (Di Renzo *et al.* 1991). L'HGF quant à lui est essentiellement produit par les cellules mésenchymateuses (Stoker *et al.* 1987). La voie HGF/MET joue un rôle majeur dans la protection, la régénération, la réparation et l'homéostasie de nombreux tissus. Une augmentation de la synthèse d'HGF est ainsi mise en évidence à la suite de lésions hépatiques (Hamanoue *et al.* 1992), rénales (Igawa *et al.* 1993), pulmonaires (Yanagita *et al.* 1993), ou spinales (Shimamura *et al.* 2007). Il a de plus été montré que l'inactivation

conditionnelle de MET dans les hépatocytes de souris augmentait la sensibilité de ces cellules au stimuli pro-apoptotiques, induisait un retard dans la régénération hépatique et favorisait l'apparition de lésions de fibrose lors de la réparation tissulaire (Huh *et al.* 2004; Factor *et al.* 2010; Marquardt *et al.* 2012). De manière similaire, l'inactivation de MET dans les kératinocytes a permis de mettre en évidence que la voie HGF MET était nécessaire au processus de cicatrisation cutanée (Chmielowiec *et al.* 2007). Enfin plusieurs travaux ont également démontré le rôle de MET dans la régénération et la réparation rénale (Dai *et al.* 2010; D. Zhou *et al.* 2013; H. Ma *et al.* 2009).

6) La régulation de la signalisation de MET

a. Les relais de signalisation membranaires

MET possède la propriété remarquable de pouvoir s'associer de manière directe ou indirecte avec de multiples molécules de signalisation membranaires. Les complexes protéiques ainsi formés, permettent de bâtir de véritables plateformes de signalisation modulant et diversifiant les réponses biologiques engendrées par MET.

i. *Les Plexines*

Les plexines sont les récepteurs transmembranaires des protéines de signalisation extracellulaire, les semaphorines (Tamagnone *et al.* 1999). Elles permettent d'activer des voies de signalisation impliquées dans le remodelage du cytosquelette, la migration et l'invasion cellulaire notamment *via* le contrôle des Rho GTPases (Y. Tong *et al.* 2007; Driessens *et al.* 2001). Les plexines et les sémaphorines présentent comme MET un domaine SEMA. Cette homologie de structure permet à MET de s'associer avec la Plexine B1, récepteur de la sémophorine SEMA 4D (Gherardi *et al.* 2004; Neufeld *et al.* 2012). Les effets de la signalisation de la plexine B1 sur MET varient selon le modèle cellulaire étudié. Ainsi, il a été rapporté dans des cellules épithéliales que la fixation de SEMA 4D sur la plexine B1 favorisait l'activation et la signalisation induite par MET augmentant ainsi les capacités migratoires des cellules étudiées (Conrotto *et al.* 2005; Silvia Giordano *et al.* 2002). A l'inverse, il a également été observé dans plusieurs lignées cancéreuses que la fixation directe de la plexine B1 sur MET induisait une diminution de la migration cellulaire (Soong and Scott 2013; Stevens *et al.* 2010; T. Sun, Krishnan, and Swiercz 2012). MET est par ailleurs

capable d'interagir avec la plexine B3 qui augmente l'activation du récepteur et favorise la mobilité des cellules HUVEC (Artigiani *et al.* 2004).

ii. CD44

Les glycoprotéines CD44 sont une famille de protéines transmembranaires comprenant plusieurs isoformes issues de l'épissage alternatif d'un même ARN. Leurs principaux ligands sont l'acide hyaluronique et l'ostéopontine. Elles sont impliquées dans la croissance tumorale et le chimiotactisme (Weber *et al.* 1996). En 1999, Van der Voort *et al.* ont montré que l'isoforme CD44v3 peut également interagir avec l'HGF favorisant ainsi la signalisation de MET (van der Voort *et al.* 1999). Par la suite il a été constaté dans plusieurs lignées cellulaires que la dispersion et l'invasion induite par l'HGF dépend de l'interaction de MET avec l'isoforme CD44v6 (Orian-Rousseau *et al.* 2002). Cette isoforme est en effet requise pour l'autophosphorylation de MET et sa signalisation d'aval *via* une interaction avec les protéines Ezrine, Radixine et Moézine (ERM) (Orian-Rousseau *et al.* 2002, 2007; Crepaldi *et al.* 1997; Damm *et al.* 2010). D'autres isoformes de CD44, peuvent renforcer la signalisation induite par MET. Ainsi dans des lignées de cancer de prostate, la liaison de l'acide hyaluronique sur CD44v9 est nécessaire à l'activation de MET par l'HGF et favorise les capacités d'invasion des cellules cancéreuses (Ghatak *et al.* 2010). Enfin, il a été établi que CD44v10 entraîne le recrutement de MET dans des radeaux lipidiques à la surface de cellules endothéliales assurant ainsi le maintien d'une barrière vasculaire efficace (Singleton *et al.* 2007). Cette interaction entre les protéines CD44 et la voie HGF/ MET a été également constatée *in vivo*. En effet, les souris KO pour CD44 présentent une haploinsuffisance pour MET et HGF (Matzke *et al.* 2007).

iii. Les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs membranaires hétéro-dimériques, formés d'une sous unité α et d'une sous unité β , responsables de l'adhésion à la matrice extracellulaire ou à d'autres cellules. Elles exercent une fonction de protéine échafaudage en recrutant un réseau de protéines qui connecte le cytosquelette d'actine à l'environnement extracellulaire (Winograd-Katz *et al.* 2014). Il s'agit également d'importantes molécules de signalisation qui permettent la transduction et l'intégration de multiples signaux. Le dialogue entre MET et les intégrines est complexe et implique des régulations réciproques pouvant être ligand

dépendante ou indépendante, conduisant le plus souvent à une augmentation de la signalisation d'aval de MET (Chan *et al.* 2006). L'intégrine dont l'interaction avec MET est la mieux étudiée est la $\alpha 6\beta 4$, récepteur de la laminine. Bien qu'individuellement les deux récepteurs favorisent l'invasion (J. Chung *et al.* 2004), plusieurs publications suggèrent que leur association amplifie leur signalisation (Franco *et al.* 2010; Trusolino, Bertotti, and Comoglio 2001; Bertotti, Comoglio, and Trusolino 2005; Yoshioka *et al.* 2013; Ephstein *et al.* 2013). En effet, l'interaction entre MET et $\alpha 6\beta 4$ favorise la phosphorylation de la sous unité $\beta 4$ entraînant l'activation de SHC et de la PI3K, indépendamment de la liaison de l'intégrine à son ligand (Trusolino, Bertotti, and Comoglio 2001). Les intégrines $\beta 1$ peuvent également s'associer à MET et induire un programme de croissance invasive ou participer à la morphogénèse rénale (Rahman *et al.* 2005; Mitra *et al.* 2011; Yingjie Liu *et al.* 2009; Ju and Zhou 2013; Barrow-McGee *et al.* 2016). Mitra et ses collaborateurs ont notamment rapporté que, dans des cellules de cancer de l'ovaire, la fibronectine favorisait l'association de $\alpha 5\beta 1$ et de MET, conduisant à la phosphorylation indépendante de l'HGF du RTK et à l'activation de SRC et FAK (Mitra *et al.* 2011).

iv. Les récepteurs tyrosine kinase (RTK)

MET joue un rôle important dans l'activation et la potentialisation d'autres RTK et inversement plusieurs RTK peuvent stimuler la voie MET. MET peut ainsi s'associer avec le récepteur RON dont il partage une homologie structurale importante. Les deux récepteurs sont en effet capables de se trans-phosphoryler en réponse à leur ligand respectif et de s'activer mutuellement en formant un hétéro-dimère, ce qui conduit à une augmentation de leur signalisation (Follenzi *et al.* 2000). Plusieurs publications ont également décrit les activations croisées de MET et d'EGFR. Par exemple, Jo *et al.* ont montré que MET dans des cellules cancéreuses épithéliales est phosphorylé et activé après une exposition à l'EGF ou au TGF α *via* une liaison directe à l'EGFR (Jo *et al.* 2000). Inversement, l'HGF est capable d'induire une phosphorylation de l'EGFR *via* l'activation de MET (Mueller *et al.* 2008; Reznik *et al.* 2008). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs d'EGFR peut bloquer la prolifération et la mobilité induite par l'HGF (Bonine-Summers *et al.* 2007; Y.-W. Zhang *et al.* 2010). Bien que MET soit capable de se lier directement à l'EGFR, plusieurs autres protéines participent à son activation dans ce contexte. Il s'agit principalement des protéines SRC, des MAPK, et des intrégrines β (Ju and Zhou 2013; Yamamoto *et al.* 2006; Breindel *et al.* 2013; Dulak *et al.*

2011). D'autres activations croisées ont été mises en évidence entre MET et d'autres RTK. Il s'agit notamment de HER2 (Shattuck *et al.* 2008; Khoury *et al.* 2005; A. Guo *et al.* 2008), HER3 (Tanizaki *et al.* 2011), IGFR1 (Bauer *et al.* 2006) et RET (Tanizaki *et al.* 2011). De manière intéressante, Tanizaki *et al.* ont observé que ces différents RTK ne participaient pas de manière équivalente aux réponses biologiques induites par MET (Tanizaki *et al.* 2011). En effet, dans un modèle cellulaire amplifié *MET*, ils ont constaté que la perte d'EGFR et d'HER3 diminuait la prolifération et la survie, tandis que la perte de RET diminuait la migration et que la perte d'HER2 diminuait la survie, la migration et la prolifération.

v. Les tétraspanines

MET peut interagir avec les protéines membranaires CD151 et CD82 appartenant à la famille des tétraspanines (Sebastian Krystian Klosek *et al.* 2005; Sridhar and Miranti 2006). CD151 est en effet capable de s'associer à MET ainsi qu'aux sous unités $\alpha 4$ et $\beta 6$ des intégrines. Ceci augmente la signalisation, la migration, et la prolifération induite par la voie MET (Franco *et al.* 2010; Sebastian K. Klosek *et al.* 2009). A l'inverse, CD82 prévient la phosphorylation de MET à la suite d'une activation par l'HGF ou par EGFR entraînant une diminution de la signalisation d'aval, de la migration et de l'invasion (Sridhar and Miranti 2006; Ying Li *et al.* 2013; Mela and Goldman 2013; Todeschini *et al.* 2007).

vi. Les récepteurs de mort Fas et DR5

La forme inactive de MET peut influencer l'apoptose en se liant avec les récepteurs de mort membranaire Fas et DR5. En effet, MET dans sa forme inactive prévient la trimérisation de Fas ainsi que le recrutement du complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex) par Fas (X. Wang *et al.* 2002; Zou *et al.* 2007; Smyth and Brady 2005). L'activation de MET par l'HGF abolit son interaction avec Fas et favorise l'apoptose induite par FasL, ligand de Fas (X. Wang *et al.* 2002; Accordi *et al.* 2007). De manière similaire MET prévient l'interaction entre le récepteur DR5 et la cytokine Trail (*tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) ainsi que l'association de DR5 avec DISC (Du *et al.* 2014).

vii. Les mucines et la E-cadherine

Les glycoprotéines transmembranaires Muc1 et Muc20, appartenant à la famille des mucines, peuvent interagir avec MET. Elles induisent une inhibition de l'invasion et de la

migration médiée par MET (Horm *et al.* 2012; Singh *et al.* 2008; Higuchi *et al.* 2004). La E-cadhérine est une protéine transmembranaire impliquée dans la formation de jonctions entre les cellules. Lors d'une stimulation par l'HGF, MET interagit directement avec la E-cadhérine, et induit son endocytose. Ceci diminue l'adhésion inter-cellulaire, augmente les capacités de migration et favorise la dispersion cellulaire (Hiscox and Jiang 1999; Kamei *et al.* 1999; Reshetnikova, Troyanovsky, and Rimm 2007).

b. Internalisation, trafic et dégradation du récepteur MET

Après son activation par son ligand l'HGF, MET, comme d'autres récepteurs tyrosine kinase, est internalisé *via* le processus d'endocytose (Naka *et al.* 1993; Kamei *et al.* 1999). L'internalisation de MET implique les molécules de clathrine et les dynamines mais également le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase Cbl (Casitas B-Cell Lineage) *via* le domaine SH3 de Grb2 (Kermorgant and Parker 2008a; Joffre *et al.* 2011; Ning Li *et al.* 2007). En effet, un complexe comprenant Cbl, l'adaptateur CIN85 et l'endophiline permet le transfert de MET depuis les puits de clathrines jusqu'aux endosomes (Garcia-Guzman, Larsen, and Vuori 2000; Petrelli *et al.* 2002; Pascal Peschard *et al.* 2004). Au cours de son transfert vers les endosomes, le récepteur internalisé reste activé et demeure capable d'induire une signalisation. Ainsi l'activation complète après une stimulation par l'HGF, de ERK1/2, ou de la GTPase Rac1 impliquée dans la migration cellulaire, requiert l'internalisation de MET et son transfert vers les endosomes (Kermorgant, Zicha, and Parker 2004; Palamidessi *et al.* 2008; Joffre *et al.* 2011). L'acheminement de MET jusqu'aux endosomes périnucléaires est de plus nécessaire à l'activation de STAT3 et à son accumulation dans le noyau (Kermorgant and Parker 2008b).

Une fois internalisé et transféré dans les endosomes, le récepteur MET est ensuite soit dégradé, soit recyclé à la membrane. L'E3 ubiquitine ligase Cbl contient un domaine reconnaissant de la tyrosine Y1003 phosphorylée de MET située dans le domaine juxtamembranaire du récepteur (P. Peschard *et al.* 2001). Cette tyrosine phosphorylée lors de l'activation de MET permet le recrutement direct de Cbl qui induit alors l'ubiquitination du récepteur. MET ubiquitinylé est ensuite transféré *via* le recrutement et la phosphorylation de la protéine HRS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) dans les endosomes tardifs, et est dégradé dans les lysosomes (D. E. Hammond *et*

al. 2001; Dean E. Hammond *et al.* 2003; Abella *et al.* 2005). Dans les endosomes, le récepteur MET peut également être recyclé à la membrane plasmique *via* le recrutement par CRK de la protéine GGA3 (Golgilocalised gamma ear-containing Arf-binding protein 3) (Parachoniak *et al.* 2011).

MET peut également être dégradé à la surface cellulaire par des clivages protéolytiques indépendamment de toute stimulation par l'HGF (Schelter *et al.* 2010; Foveau *et al.* 2009). En effet les métalloprotéases membranaires de la famille ADAM sont capables de cliver le domaine extracellulaire de MET au niveau d'une région située à proximité de la membrane plasmique libérant ainsi dans le milieu extracellulaire un fragment N-terminal appelé MET soluble. Le fragment C-terminal formé par le domaine intracellulaire et transmembranaire du récepteur subit ensuite un nouveau clivage protéolytique par la γ -sécrétase conduisant à la libération dans le cytoplasme d'un fragment intracellulaire qui sera enfin dégradé par le protéasome. Ces clivages, également susceptibles de survenir au sein des endosomes (Ancot *et al.* 2012), permettent de réguler la demi-vie du récepteur. Par ailleurs en condition de stress apoptotique MET peut être clivé et dégradé par les caspases au niveau des résidus D1002 et D1374. Ceci entraîne la formation d'un fragment intracellulaire appelé p40 MET qui amplifie le processus apoptotique (Foveau *et al.* 2007; Tulasne *et al.* 2004; Lefebvre *et al.* 2013).

c. Les phosphatases

Les tyrosines phosphatases sont une vaste famille d'enzymes cytosoliques ou transmembranaires responsables de l'hydrolyse du groupement phosphate des tyrosines phosphorylées. En déphosphorylant plusieurs résidus tyrosine de MET, les phosphatases régulent négativement l'activité du récepteur. Ainsi, les tyrosines Y1234 et Y1235 de la boucle d'activation de MET sont déphosphorylées par les phosphatases PTP-1B et la T-cell phosphatase (Sangwan *et al.* 2008). La tyrosine phosphatase RPTP- β déphosphoryle la tyrosine Y1356 et inhibe ainsi la signalisation d'aval de MET (Xu *et al.* 2011, 2012). Enfin, CD148 déphosphoryle la tyrosine 1349 empêchant le recrutement des effecteurs de signalisation comme GAB1 (Palka, Park, and Tonks 2003).

d. La sérine 985

La sérine 985 située dans le domaine juxtamembranaire de MET est phosphorylée par les PKC δ et ϵ , et déphosphorylée par la phosphatase PPA2 (Protein phosphatase A2) (Hashigasako *et al.* 2004). Elle participe à la régulation négative du récepteur en inhibant la phosphorylation des tyrosines au sein de son domaine kinase inhibant ainsi son activité catalytique (Gandino *et al.* 1994). *In vivo*, la régénération hépatique nécessitant l'activation de la voie HGF/MET s'accompagne d'une diminution de la phosphorylation de la sérine 985 suggérant l'implication de ce résidu dans la régulation physiologique de l'activité de MET (Nakayama *et al.* 2013).

7) Les dérégulations de MET dans le cancer

La voie HGF/MET est capable d'induire un programme de croissance invasive associant prolifération cellulaire, mobilité et résistance à l'apoptose. A l'état physiologique l'activation de cet axe de signalisation est hautement régulée. En pathologie humaine, l'activation aberrante de la voie HGF/MET est impliquée dans le développement de nombreux cancers. Plusieurs mécanismes de dérégulation ont été mis en évidence comme la surexpression de MET, la sécrétion autocrine ou paracrine de l'HGF, l'amplification du gène *MET*, la survenue de mutations de *MET*, ou l'apparition de fusion génique impliquant *MET*.

a. La surexpression de MET

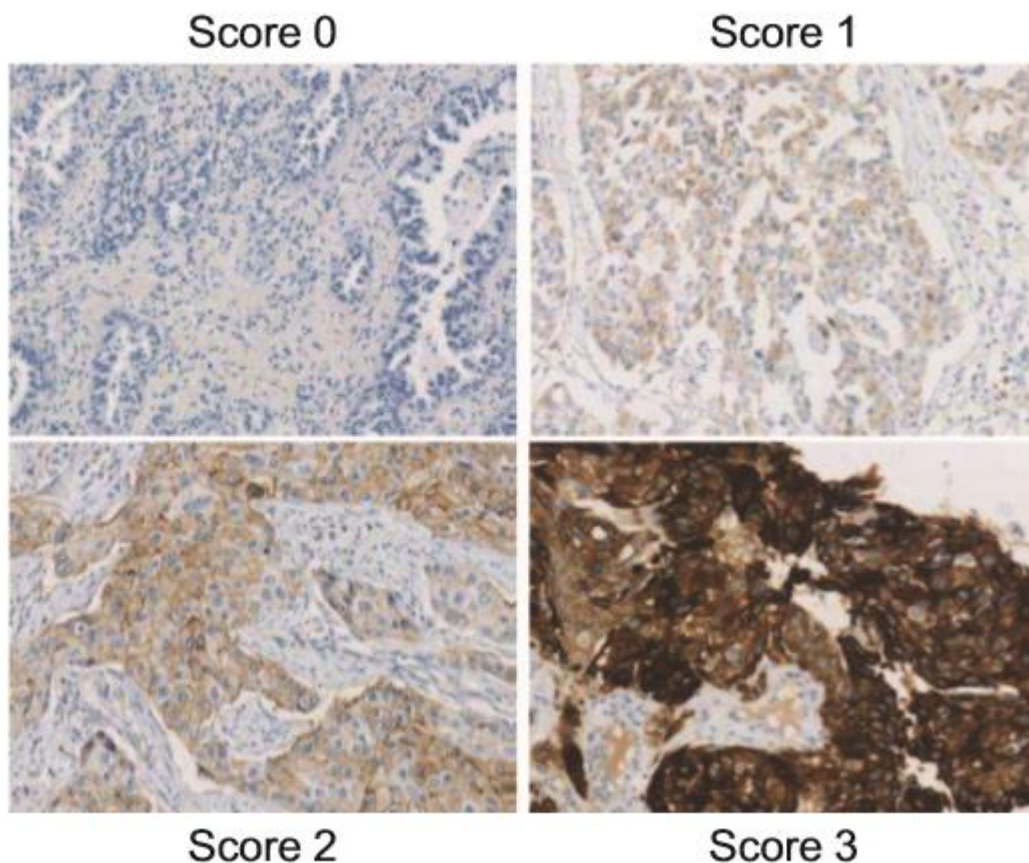
L'implication de la surexpression de MET dans la tumorigenèse a été mise en évidence dans plusieurs modèles murins. En effet, il a été démontré *in vivo* que la seule surexpression de MET était capable d'induire des tumeurs mammaires ou hépatiques (Ponzo *et al.* 2009; R. Wang *et al.* 2001). Différents mécanismes peuvent concourir à la surexpression de MET dans les cancers. Tout d'abord, certaines altérations génétiques, modifiant la synthèse ou la dégradation du récepteur, comme l'amplification de *MET* ou les mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de *MET*, sont associées à une augmentation de l'expression de MET (Schildhaus *et al.* 2015; J. H. Tong *et al.* 2016). Ces anomalies sont respectivement détaillées dans les paragraphes ci-dessous. Ensuite, des modifications épigénétiques peuvent modifier l'expression de MET. Ainsi, l'hypométhylation de *MET* est corrélée à une expression élevée du récepteur dans les adénocarcinomes canaux

pancréatiques (Nones *et al.* 2014). Une augmentation de l'expression de MET peut aussi être secondaire à une activation de la transcription soit en réponse à l'hypoxie *via* le facteur HIF1 α (Pennacchietti *et al.* 2003), soit à la suite d'une dérégulation des facteurs de transcription Ets1 ou AP1 (Seol, Chen, and Zarnegar 2000; Furlan *et al.* 2008). La surexpression de MET peut également être induite par l'inhibition de plusieurs micro-ARN bloquant la traduction de l'ARNm de MET comme miR-1 (Migliore *et al.* 2012), miR-31 (Mitamura *et al.* 2013), miR-34a et b (Ying Zhang *et al.* 2014; Migliore *et al.* 2008), miR-139-5p (C. Sun *et al.* 2015), ou miR-144-3p (Lan *et al.* 2015). Actuellement on estime que plus d'une trentaine de micro-ARN sont impliqués dans la régulation de MET (Karagonlar, Korhan, and Atabey 2015). Par ailleurs, la protéine p53 régule négativement l'expression de MET en favorisant l'expression de miR-34 et en inhibant la fixation de SP-1 sur le promoteur de MET. Par conséquent, l'inactivation de p53 est à même d'induire une surexpression de MET dans les cellules cancéreuses (Hwang *et al.* 2011). Enfin, il a été montré que la phosphorylation de la tyrosine Y1313 de MET permet le recrutement de la Tensine 4 qui prévient la dégradation du récepteur et est associée à la surexpression de MET dans les cancers du colon et de l'ovaire (Muharram *et al.* 2014).

L'expression du récepteur MET a été étudiée dans de nombreux cancers principalement par immunohistochimie (IHC), par western blot, ou par RT-qPCR (Yanni Zhang, Du, and Zhang 2016). Il s'agit d'un événement fréquent mais dont la prévalence varie de manière importante selon le type de cancer, la technique utilisée, et le seuil retenu pour définir la surexpression. Ainsi en immunohistochimie une surexpression de MET a été mise en évidence dans 9.6 à 71% des cancers gastriques (An *et al.* 2014; Huang *et al.* 2001), 13.7 à 70% des cancers bronchiques non à petites cellules (Sanghui Park *et al.* 2012; Tsao *et al.* 2001), 20 à 87.5% des carcinomes hépatocellulaires (Kiss *et al.* 1997; Chau *et al.* 2008), et 25 à 60% des cancers du sein (Ghoussoub *et al.* 1998; G. V. Scagliotti, Novello, and von Pawel 2013). En utilisant, en IHC, l'anticorps monoclonal SP44 dirigé contre MET ainsi que le système d'évaluation qui lui est associé (Figure 5), la prévalence de surexpression de MET dans les cancers bronchiques non à petites cellules métastatiques est estimée à environ 50% (Spigel *et al.* 2013). La surexpression de MET a été associée à un mauvais pronostic dans les cancers bronchiques non à petites cellules (B. Guo *et al.* 2014), les carcinomes mammaires (Yan *et al.* 2015), et les cancers gastriques (Peng *et al.* 2014). Cependant le lien entre

surexpression et activation du récepteur reste controversé. En effet si certaines études ont observé une association entre expression de MET et phosphorylation des résidus tyrosine témoins de l'activation du récepteur (Y. Nakamura *et al.* 2007; Copin *et al.* 2016), d'autres travaux ne retrouvent pas cette corrélation (Watermann *et al.* 2015; Tsuta *et al.* 2012). De plus plusieurs essais cliniques de grande ampleur n'ont pas mis en évidence d'efficacité des inhibiteurs de MET dans les cancers bronchiques non à petites cellules présentant une surexpression MET (Spigel *et al.* 2017; G. Scagliotti *et al.* 2015).

Figure 5 : Score d'expression tumorale de MET en Immunohistochimie avec l'anticorps monoclonal SP44 (Montagne *et al.* 2015). Le score 0 correspond à une absence de marquage ou à un marquage présent dans moins de 50% de cellules tumorales quelque soit son intensité. Le score 1 correspond à une intensité de marquage faible d'au moins 50% des cellules tumorales ou à un marquage modéré de moins de 50% des cellules tumorales. Le score 2 correspond à une intensité modérée d'au moins 50% des cellules tumorales ou à un marquage fort de moins de 50% des cellules tumorales, et le score 3 à une intensité forte d'au moins 50% des cellules tumorales.



b. La sécrétion d'HGF

L'HGF peut être sécrété de manière paracrine par les cellules du stroma tumoral ou de manière autocrine par les cellules tumorales elles-mêmes (Ferracini *et al.* 1995). Plusieurs lignées cellulaires humaines comme la lignée SNU-484, dérivée d'un cancer gastrique, ou la lignée U-87, dérivée d'un gliome, présentent une sécrétion autocrine d'HGF (Minseon Park *et al.* 2005; Ying Zhang *et al.* 2013). Dans ces modèles cellulaires, l'inhibition de la voie HGF/MET par un inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) ou par un anticorps bloquant l'HGF induit une inhibition de la prolifération cellulaire. Le rôle oncogénique de l'HGF a été confirmé *in vivo* dans des modèles de souris surexprimant ce facteur de croissance. En effet, les souris qui surexpriment l'HGF dans l'ensemble de leur organisme, développent spontanément des mélanomes, des sarcomes ou des carcinomes (Takayama *et al.* 1997). Lorsque la surexpression est restreinte au niveau des glandes mammaires, les souris développent des tumeurs mammaires pouvant métastaser au poumon (Gallego, Bieri, and Hennighausen 2003). Chez l'homme, une augmentation de la sécrétion d'HGF, mesurée au niveau sérique par ELISA ou au niveau tissulaire par IHC, a été observée et associée à un mauvais pronostic dans les cancers bronchiques à petites cellules (Canadas *et al.* 2013), les cancers bronchiques non à petites cellules (Siegfried *et al.* 1997), les cancers du sein (H. Yang, Zhang, and Cui 2015; Toi *et al.* 1998), les cancers de la prostate (Gupta *et al.* 2008), les cancers rénaux à cellules claires (Tanimoto *et al.* 2008), les mélanomes (Hügel *et al.* 2016) et les gliomes (X. Zhang *et al.* 2013). Enfin, il a été montré qu'un taux élevés d'HGF dans les lavages broncho-alvéolaires de patients atteints de carcinomes bronchioloalvéolaires était un facteur de risque indépendant de mortalité (Wislez *et al.* 2003).

c. L'amplification de MET

Le rôle oncogénique de l'amplification du gène *MET* a été initialement identifié dans des fibroblastes de souris NIH3T3, qui présentaient une transformation cancéreuse spontanée, lors d'expériences de transfections utilisant de l'ADN provenant de cellules néoplasiques ou non néoplasiques (Cooper *et al.* 1986). En effet, dans ces cellules, il était constaté par Southern blot une augmentation du nombre de copies du gène *MET* endogène, conduisant à une augmentation majeure de l'ARNm de MET. L'amplification *MET* a par la suite été détectée dans les cellules GTL16, une lignée cellulaire de tumeur gastrique

humaine dérivée d'un sous-clone de la lignée MKN45 (S. Giordano *et al.* 1989). Dans ce modèle, l'amplification de *MET* conduit à une synthèse massive du récepteur et à son activation constitutive, indépendamment de la stimulation par le ligand. Plus tard, plusieurs lignées de cellules cancéreuses *MET* amplifiées ont été caractérisées et utilisées dans des études précliniques d'inhibition de *MET*. Il s'agit notamment de lignées cellulaires dérivées de cancers du poumon (EBC-1, H1993) (Zhao *et al.* 2005) ou de cancers gastriques (MKN45, GTL-16, SNU5, Katoll) (Ponzetto *et al.* 1991; Rege-Cambrin *et al.* 1992; Smolen *et al.* 2006). Ces lignées cellulaires ont permis de mettre en évidence un phénomène d'addiction oncogénique secondaire à l'amplification de *MET*. En effet, il est possible d'induire, dans ces modèles, un arrêt de la croissance cellulaire et/ou la mort cellulaire par traitement avec un ITK de *MET* tel que PHA-665752 (Smolen *et al.* 2006) ou par inhibition de l'expression de *MET* via un shRNA (Lutterbach *et al.* 2007). Jusqu'à présent, il n'existe pas de modèle *in vivo* reproduisant l'amplification de *MET*. Cependant l'efficacité des thérapies ciblant *MET in vivo* a pu être évaluée grâce à des modèles de xénogreffes de lignées cellulaires présentant une amplification *MET* ou de xénogreffes de cellules tumorales dérivées du patients (PDX). Une étude a ainsi montré, dans deux modèles PDX de cancers rénaux présentant une amplification de *MET*, une inhibition de la croissance tumorale en réponse à AZD6094, un inhibiteur sélectif de *MET* (Schuller *et al.* 2015).

La fréquence de l'amplification de *MET* varie selon le type de cancer étudié, la technique utilisée (Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR), Comparative Genomic Hybridization array (CGH array)), et les critères de mesure retenus pour sa définition. En retenant une définition fondée sur un ratio $MET/CEP7 \geq 2$ (nombre de copie de *MET*/nombre de copie du centromère du chromosome 7) en FISH, l'amplification de *MET* est mise en évidence chez 3 à 5% des patients atteints de CBNPC, de cancers gastriques, de carcinomes hépatocellulaires, de carcinomes nasopharyngés ou de tumeurs gliales. Dans la plupart des cas, l'amplification *MET* est corrélée à un fort niveau d'expression protéique du récepteur ainsi qu'à un mauvais pronostic (Seongyeol Park *et al.* 2015; Pyo, Kang, and Cho 2016; Yingqin Li *et al.* 2015; Burel-Vandenbos *et al.* 2017; Kondo *et al.* 2013; K. Wang *et al.* 2013). Dans le cancer gastrique, par exemple, les tumeurs *MET* amplifiées présentent une survie globale plus courte que celles ne présentant pas cette altération (Catenacci *et al.* 2017). Dans les carcinomes du sein,

l'amplification du gène *MET* est associée à un risque accru de récurrence à distance chez les patients traités par chimiothérapie (Veenstra *et al.* 2016). Enfin dans les gliomes, l'amplification du gène *MET* est associée à l'agressivité du gliome, et ne se retrouve que dans les tumeurs de grade IV (Kwak *et al.* 2015).

d. Les mutations de MET

i. *Mutations du domaine kinase de MET*

Les mutations activatrices du domaine kinase de MET ont pour la première fois été décrites dans les carcinomes papillaires rénaux sporadiques et héréditaires (L. Schmidt *et al.* 1997). Il s'agit de mutations faux sens du domaine kinase (M1149T, V1206L, V1238L, D1246N, D1246H, Y1228C et M1268T) situées à proximité des résidus tyrosine Y1234 et Y1235 (L. Schmidt *et al.* 1997, 1998; Durinck *et al.* 2015). Ce type de mutations a également été rapporté dans les carcinomes hépatocellulaires infantiles (M1268I) (W. S. Park *et al.* 1999) et dans les cancers avancés de la tête et du cou (Y1253D) (Aebersold *et al.* 2003; Ghadjar *et al.* 2009). *In vitro*, ces altérations entraînent généralement une activation constitutive de MET et favorisent la transformation des cellules fibroblastiques en cellules cancéreuses (Jeffers *et al.* 1997). Cependant, il semble que pour certaines de ces mutations une stimulation par l'HGF soit nécessaire au processus de transformation cancéreuse (Michieli *et al.* 1999). Par ailleurs, certaines mutations (M1268T et D1246N) affectent non seulement l'activité du récepteur mais aussi son trafic intracellulaire en favorisant son recyclage à la membrane plasmique (Joffre *et al.* 2011). L'implication de ces mutations dans la tumorigenèse a été confirmée par des modèles murins de souris knock-in exprimant une version mutée du récepteur MET (D1226N, Y1228C, M1248T, M1248T/L1193V) (C. Graveel *et al.* 2004a; C. R. Graveel, London, and Vande Woude 2005). En effet, des processus néoplasiques ont été observés dans ces différentes lignées murines. Néanmoins le type de tumeur obtenue n'était pas le même pour toutes les mutations. Par exemple, les souris présentant la mutation MET 1248T ont développé des tumeurs associant des carcinomes et des lymphomes, tandis que les souris présentant les mutations D1226N, Y1228C et M1248T/L1193V ont développé principalement des sarcomes et des lymphomes (C. Graveel *et al.* 2004b). Chez l'homme, l'efficacité des inhibiteurs de MET sur les tumeurs porteuses de ce type d'altération est encore incertaine. Un essai clinique de phase II évaluant l'efficacité

du foretinib, un ITK multi-cibles de MET et de VEGFR, chez des patients atteints de cancer papillaire rénal, avec ou sans mutations germinales du domaine kinase de MET a mis en évidence un taux de réponse de 50% chez les patients porteurs de mutations germinales contre 8.8% chez les patients ne présentant pas ces altérations. Ceci suggère que les mutations germinales du domaine kinase de MET pourraient être prédictives d'une réponse à un inhibiteur de MET (Choueiri *et al.* 2013).

ii. Mutations du domaine extracellulaire et du domaine juxtamembranaire de MET

Plusieurs mutations du domaine extracellulaire de MET, comme la substitution N375S, ont été décrites dans les cancers du poumon et sont principalement localisées au sein du domaine SEMA de MET (P. C. Ma *et al.* 2003, 2008). Cependant, leurs conséquences fonctionnelles sont encore mal connues et controversées. Ainsi, la mutation N375S existe au niveau germinale dans la population asiatique, et ne semble pas augmenter le risque de cancer (Shieh *et al.* 2013). Elle pourrait donc correspondre à un simple polymorphisme. D'autres mutations du récepteur affectent le domaine juxtamembranaire, comme les substitutions R970C, P991S et T992I. Elles ont été décrites dans 3 à 10% des cancers du poumon (Krishnaswamy *et al.* 2009; Tyner *et al.* 2010; Boland *et al.* 2013). Plusieurs études pré-cliniques ont démontré qu'elles favorisent la croissance tumorale sans pour autant induire une activation du domaine kinase de MET (J. H. Lee *et al.* 2000; Tyner *et al.* 2010; P. C. Ma *et al.* 2003). Du fait de l'absence d'activation du domaine kinase de MET induite par ces mutations, leur rôle reste controversé. Par ailleurs, elles ont également été mises en évidence au niveau germinale et pourraient donc correspondre à de simples polymorphismes (J. H. Lee *et al.* 2000).

iii. Mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de MET

Ces mutations sont responsables d'un épissage alternatif entraînant un saut de l'exon 14 de MET. Leurs caractéristiques et leurs conséquences biologiques sont détaillées dans l'article 3 de la partie travaux personnels.

e. Les fusions de MET

Comme évoqué précédemment, le récepteur MET a été découvert en 1984 dans la lignée cellulaire d'ostéosarcome humain HOS, traitée par un composé chimique carcinogène le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Ces cellules présentaient un réarrangement chromosomique conduisant à la fusion d'une partie du gène *TPR* avec celui de *MET*. La protéine chimérique résultante, TPR-MET, contient le domaine kinase de MET amputé de son domaine de régulation négatif juxtamembranaire (Cooper *et al.* 1984; Vigna *et al.* 1999). La partie TPR de cette protéine de fusion, comprend un motif induisant sa dimérisation constitutive et conduisant ainsi à l'activation du domaine kinase de la partie MET. Bien que cette protéine de fusion soit responsable d'une transformation cellulaire *in vitro* et de la formation de tumeurs chez la souris (P. Peschard and Park 2007), la fusion TPR-MET n'a pas été retrouvée dans les tumeurs humaines (Heideman *et al.* 2001).

En 2014, grâce au séquençage à haut débit de l'ARN tumoral, diverses fusions de *MET* ont été décrites dans plusieurs types de cancers. Ainsi, quatre réarrangements impliquant le gène *PTPRZ1* (*receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta*) et le gène *MET* ont été décrits dans les glioblastomes suite au séquençage de l'ARN tumoral de 272 patients (Bao *et al.* 2014). Les fusions *PTPRZ1-MET* présentent la particularité de préserver la totalité de la séquence du récepteur MET. Elles sont responsables d'une augmentation de l'expression et de la phosphorylation du récepteur MET (H.-M. Chen *et al.* 2015). Par ailleurs, le traitement par un ITK MET, le crizotinib, d'un patient pédiatrique atteint d'un glioblastome présentant une fusion *PTPRZ1-MET* a permis d'obtenir une diminution transitoire des lésions tumorales (International Cancer Genome Consortium PedBrain Tumor Project 2016). De plus, dans les glioblastomes pédiatriques, deux fusions supplémentaires ont été découvertes, impliquant le gène *CLIP2* et le gène *TFG* (*TRK-fused gene*). Les deux protéines chimériques résultantes ont une structure proche de la fusion TPR-MET à l'origine de la découverte MET, puisqu'elles contiennent le domaine MET kinase et excluent le domaine de régulation négative juxtamembranaire (International Cancer Genome Consortium PedBrain Tumor Project 2016). Dans le mélanome, des fusions de MET présentant également une structure analogue à *TPR-MET* ont également été identifiées avec divers partenaires N-terminaux (*TRIM4*, *ZKSCAN1*, *PPFIBP1*, *LRRFIP1*, *EPS15*, *DCTN1*). *In vitro*, les fusions *TRIM4-MET* et *ZKSCAN1-MET* sont responsables de la synthèse de protéines chimériques constitutivement phosphorylées et

induisent la formation de tumeurs dans des modèles animaux de xénogreffe (Yeh *et al.* 2015). Enfin, le cas clinique d'un patient atteint d'un adénocarcinome pulmonaire présentant une fusion *HLA-DRB1-MET* a récemment été rapporté. A nouveau de manière similaire à la fusion *TPR-MET*, la protéine chimérique *HLA-DRB1-MET* inclut le domaine kinase de MET sans la séquence régulatrice juxtamembranaire. Le traitement de ce patient par crizotinib a conduit à une réponse tumorale majeure sur 8 mois (Davies *et al.* 2017). Au total, diverses fusions *MET* ont été décrites dans au moins trois types de cancers et deux cas de réponse à un inhibiteur de MET chez des patients présentant des fusions *MET* ont été rapportés. Ces résultats suggèrent que de telles fusions peuvent créer une situation d'addiction oncogénique accessible à un traitement inhibiteur de MET.

II. MET et les cancers bronchiques non à petites cellules EGFR muté

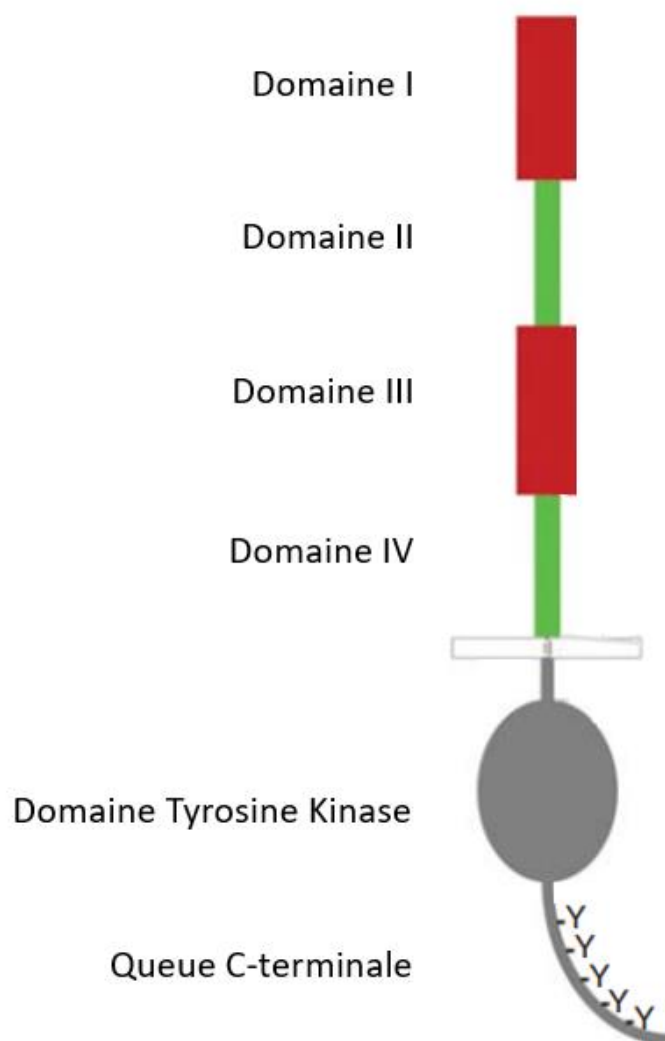
1) Epidémiologie des cancers pulmonaires

Le cancer pulmonaire est la première cause de mortalité par cancer en France et dans le monde. Avec 1.8 million de nouveaux cas par an, il s'agit du premier cancer en terme d'incidence au niveau mondial (Torre *et al.* 2015). Les principaux facteurs de risque à l'origine de cette pathologie sont l'exposition au tabac, à l'amiante, et dans une moindre mesure, aux métaux lourds, aux radiations ionisantes et aux polluants atmosphériques (Alberg *et al.* 2013). 87% des cancers pulmonaires sont des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) (DeSantis *et al.* 2014). A un stade métastatique le pronostic de ces cancers reste sombre avec seulement 4% de patients en vie à 5 ans (Siegel *et al.* 2012). Néanmoins, l'identification d'altérations moléculaires à l'origine de la survenue du processus tumoral a conduit au développement de thérapies ciblées qui ont démontré leur efficacité et augmenté l'espérance de vie de certains patients. Le meilleur exemple de cette approche thérapeutique est représenté par les ITK du récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGFR) dans le traitement des CBNPC porteurs d'une mutation EGFR.

2) L'EGFR et la découverte de ses mutations dans les cancers bronchiques non à petites cellules

L'EGFR (aussi appelé HER1) est un RTK appartenant à la famille ERBB, elle-même composée de 4 membres (HER ou ERBB 1 à 4) (Yosef Yarden and Pines 2012). Le gène de l'EGFR est situé sur le bras court du chromosome 7 (7p11) et code pour une protéine de 1186, constituée d'un domaine extracellulaire subdivisé en 4 sous domaines, d'une hélice transmembranaire et d'un domaine intracellulaire porteur de l'activité kinase (Figure 6).

Figure 6 : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels de l'EGFR (adapté de (Lemmon, Schlessinger, and Ferguson 2014)).



L'EGFR est capable de lier 7 ligands différents qui partagent tous un domaine EGF-like permettant leur fixation au récepteur (Harris, Chung, and Coffey 2003; Schneider and Wolf 2009). Il s'agit de l'EGF, du TGF- α , de la bétacelluline (BTC), de l'HB-EGF, de l'amphiréguline (aussi appelé ARG), de l'épiréguline (aussi appelée EPR), et de l'EGN. La fixation de l'un des ligands sur les sous domaines extracellulaires I et III d'EGFR induit son homo-dimérisation ou son hétéro-dimérisation avec ERBB2, ERBB3 ou ERBB4 (Y. Yarden and Sliwkowski 2001; Ferguson *et al.* 2000). Ceci entraîne l'activation du récepteur et la phosphorylation des résidus tyrosine de la queue C-terminale. Les tyrosines phosphorylées servent alors de site d'ancrage multi-substrats pour des protéines de signalisation porteuses d'un domaine de reconnaissance SH2 (Lemmon, Schlessinger, and Ferguson 2014). Plusieurs voies de signalisation d'aval sont enfin activées dont la voie PI3K/AKT et RAS/MAPK induisant ainsi des réponses de prolifération et de survie cellulaire. L'activité d'EGFR est nécessaire au développement embryonnaire de différents organes dont la peau, les yeux, le cœur, le système nerveux, et les os (Sibilia *et al.* 2007).

Dans les cancers pulmonaires, les mutations activatrices d'EGFR ont été découvertes simultanément par deux équipes en 2004 (Lynch *et al.* 2004; Paez *et al.* 2004). Il s'agit de mutations survenant exclusivement dans le domaine tyrosine kinase d'EGFR, codé par les exons 18 à 21 (Johnson and Jänne 2005). Deux de ces altérations représentent 90% de l'ensemble des mutations d'EGFR : les délétions dans l'exon 19, et la substitution L858R dans l'exon 21. Les autres altérations décrites sont des mutations dans l'exon 18 (substitution G719X, 3%), l'exon 20 (substitution T790M, 2%), l'exon 21 (substitution L861Q, 2%) et des insertions dans l'exon 20 (5%). Les mutations d'EGFR sont en règle générale mutuellement exclusives de la présence d'altérations dans d'autres oncogènes comme ALK, KRAS, ERBB2, ou BRAF (Cancer Genome Atlas Research Network 2014; Gainor *et al.* 2013). Elles ont pour conséquence une activation constitutive de la kinase d'EGFR, indépendante de la liaison de son ligand. Ceci induit une activation des voies de signalisation sous-jacentes, PI3K-AKT et RAS-MAPK, aboutissant à un signal excessif et incontrôlé de survie et de prolifération cellulaire, à l'origine du phénotype transformant et de la croissance tumorale. Parallèlement, la présence d'une mutation d'EGFR est généralement associée à un phénomène de talon d'Achille : la perte d'expression ou l'inhibition de l'activité kinase d'EGFR entraînent une inhibition des voies sous-jacentes, un arrêt de la prolifération cellulaire et une fonte tumorale.

3) Caractéristiques cliniques des cancers bronchiques non à petites cellules EGFR mutés

En France, les mutations d'EGFR sont détectées chez 11% des patients atteints de CBNPC (Barlesi *et al.* 2016). Elles sont retrouvées presque exclusivement dans les tumeurs de type non épidermoïdes et observées plus fréquemment chez les non-fumeurs, les femmes, et les patients d'origine asiatique. Cependant, ces critères cliniques ne sont pas suffisamment prédictifs de la présence d'une mutation d'EGFR. Par exemple, écarter les hommes et les fumeurs d'une recherche systématique de mutation d'EGFR conduirait à manquer plus de 57% des patients porteurs d'une mutation du récepteur (D'Angelo *et al.* 2011). C'est pourquoi une recherche systématique de mutation d'EGFR est recommandée dans les CBNPC non épidermoïdes avancés quel que soit le statut tabagique, le sexe ou l'origine ethnique du patient (Novello *et al.* 2016).

4) Traitement des cancers bronchiques non à petites cellules EGFR mutés métastatiques

Quatre inhibiteurs d'EGFR, le géfitinib, l'erlotinib, l'afatinib et l'osimertinib possèdent une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement des CBNPC EGFR mutés métastatiques. Les deux premiers sont des inhibiteurs spécifiques d'EGFR, dits de première génération, qui se fixent de façon réversible à l'EGFR muté. Ils disposent d'une AMM dans les CBNPC EGFR mutés quelle que soit la ligne de traitement. L'afatinib est un ITK EGFR dit de deuxième génération, qui se distingue du géfitinib ou de l'erlotinib de 2 manières : d'une part, il s'agit d'un inhibiteur « pan-HER », c'est-à-dire capable d'inhiber l'activité kinase de tous les membres de la famille HER. D'autre part, il s'agit d'un ITK irréversible capable de se lier au récepteur EGFR de façon définitive par une liaison covalente (Riely 2008). Il possède une AMM dans le traitement des patients atteints d'un CBNPC EGFR muté métastatique naïf de traitement par un ITK EGFR. Enfin, l'osimertinib est un ITK EGFR dit de 3^{ème} génération, irréversible, qui se distingue par sa capacité à inhiber le récepteur EGFR y compris en présence d'une mutation T790M, altération sur laquelle les inhibiteurs de première et deuxième génération sont inefficaces (W. Zhou *et al.* 2009). L'osimertinib possède une AMM

dans le traitement des patients atteints d'un CBNPC EGFR muté et pour lesquels une mutation T790M a été mise en évidence.

Plusieurs études de phase III ont démontré la supériorité en première ligne des ITK EGFR de première et deuxième génération sur la chimiothérapie à base de sel de platine dans les CBNPC EGFR mutés. Elles ont notamment toutes mis en évidence un bénéfice en termes de taux de réponse (environ 60-70%), et de survie sans progression (SSP), avec une médiane de 9-13 mois (Tableau 1). Aucune de ces études n'a mis en évidence de bénéfice en termes de survie globale. Cette absence de bénéfice pourrait être expliquée par le taux important de cross-over, permettant aux patients du bras « chimiothérapie » de bénéficier d'un ITK EGFR en 2^{ème} ligne ou au-delà. La médiane de survie globale dans toutes ces études atteint néanmoins 20 à 30 mois, bien au-delà des médianes observées avec la chimiothérapie dans les séries historiques.

Tableau 1 : Résultats des essais de phase 3 comparant la chimiothérapie aux ITK EGFR en première ligne (adapté de (Cortot and Jänne 2014))

Auteurs	Zone géographique	ITK EGFR	Taux de réponse (%) ITK/chimiothérapie	SSP médiane ITK (mois)	SSP Hasard Ratio, IC95%	Survie globale médiane ITK (mois)
Mok (Mok <i>et al.</i> 2009)	Asie	Géfitinib	71/47	9,5	0,48 (0,36 - 0,64)	21,6
Mistudomi (Mitsudomi <i>et al.</i> 2010)	Asie	Géfitinib	62/32	9,2	0,49 (0,34 – 0,71)	36
Maemondo (Maemondo <i>et al.</i> 2010)	Asie	Géfitinib	74/31	10,4	0,30 (0,22 – 0,41)	30,5
Zhou (C. Zhou <i>et al.</i> 2011)	Asie	Erlotinib	83/36	13,1	0,16 (0,10 – 0,26)	22,7
Rosell (Rosell <i>et al.</i> 2012)	Europe	Erlotinib	58/15	9,7	0,37 (0,25 – 0,52)	22,9
Yang (J. C.-H. Yang <i>et al.</i> 2015)	Asie/Europe	Afatinib	56/23	11,1	0,58 (0,43 - 0,78)	31,6
Wu (Wu <i>et al.</i> 2014)	Asie	Afatinib	66,9/23	11	0,28 (0,20 - 0,39)	23,6

5) Résistance aux ITK EGFR : mécanismes et traitement

Tous les patients répondeurs ou contrôlés par ITK EGFR présenteront une progression tumorale, qui survient généralement 9 à 12 mois après l'instauration du traitement. On distingue la résistance primaire survenant avant le 3^{ème} mois de traitement par ITK EGFR, de la résistance secondaire ou acquise qui apparaît plus tardivement et qui représente 90% des cas de résistance. Plusieurs facteurs peuvent expliquer la résistance primaire : la non-observance du traitement, l'altération du métabolisme de l'ITK EGFR notamment du fait d'un tabagisme actif ou d'un traitement interférant avec le cytochrome P450 (y compris la phytothérapie), la présence d'une mutation de résistance aux ITK-EGFR (insertion exon 20, mutation T790M), ou l'existence d'autres altérations oncogéniques (polymorphisme de BIM, perte de PTEN, mutation PIK3CA) (Chong and Jänne 2013; Eck and Yun 2010; De Pas *et al.* 2011; Costa *et al.* 2014). Il est à noter que les lésions osseuses ostéocondensantes hypermétaboliques apparaissant sous ITK-EGFR sont le reflet d'une réaction ostéoblastique et ne doivent pas être considérées comme une progression mais comme une réponse aux ITK-EGFR (Pluquet *et al.* 2010).

La résistance acquise a été définie par Jackman selon les critères suivants (Jackman *et al.* 2010) :

- Traitement par ITK EGFR en monothérapie pendant au moins 1 mois
- Présence d'une mutation activatrice d'EGFR ou bénéfique clinique objectif (>6 mois) sous ITK EGFR
- Progression tumorale (définie selon les critères RECIST (Eisenhauer *et al.* 2009)), apparaissant sous traitement ou dans un délai de 30 jours après l'arrêt du traitement par ITK EGFR.

Les mécanismes à l'origine d'une résistance secondaire sont bien identifiés, et doivent être recherchés sur une nouvelle biopsie tumorale pratiquée lors de la progression sous ITK EGFR. Ils sont divisés en 3 grandes catégories (Cortot and Jänne 2014; Chong and Jänne 2013) :

- l'acquisition de la mutation d'EGFR T790M survenant en cis de la mutation EGFR initiale dans 50-60% des cas de résistance et diminuant l'affinité du récepteur pour les ITK EGFR de première et deuxième génération (Oxnard *et al.* 2011; W. Zhou *et al.* 2009; Cross *et al.* 2014).

- l'activation d'autres récepteurs tyrosine kinase comme MET, HER2, IGF1R, ou AXL, dans 20 à 40% des cas de résistance, ce qui permet un maintien de l'activation des voies de signalisation PI3K/AKT et RAS/MAPK malgré l'ITK EGFR (Engelman *et al.* 2007; Takezawa *et al.* 2012; Peled *et al.* 2013; Z. Zhang *et al.* 2012)

- la transformation histologique dans 2-10% des cas de résistance qui inclut les phénomènes de transition épithélio-mésenchymateuse et de transdifférenciation (transformation d'une histologie de type adénocarcinome en carcinome bronchique à petites cellules) (Sequist *et al.* 2011).

Des innovations techniques récentes ont permis de montrer la pré-existence de certains mécanismes de résistance acquise au sein d'une population tumorale naïve de tout traitement. Ainsi, Turke *et al.* ont constaté en analysant, par FISH à haut débit, plus de 4200 cellules de la lignée HCC827 dérivée d'un CBNPC EGFR muté, la pré-existence de 0.14 % de cellules porteuses d'une amplification de *MET* avant le traitement par ITK EGFR (Turke *et al.* 2010). Cette hétérogénéité tumorale a récemment été modélisée à l'aide de la technique du Crispr-Cas9 barcoding (Guernet *et al.* 2016). Cette technique permet l'introduction, dans le génome d'une partie des cellules, d'une mutation spécifique d'intérêt (par exemple la mutation T790M) associée à un barcode, constitué d'une mutation silencieuse, permettant le suivi de la sous-population mutée. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence la pression de sélection exercée par un traitement par ITK EGFR à l'origine de l'émergence d'une sous-population résistante au traitement.

La survenue de la mutation T790M, et la transformation histologique en cancer bronchique à petites cellules sont les seuls mécanismes qui conduisent actuellement à des prises en charge spécifiques hors essais cliniques. En effet, en cas de mise en évidence d'une mutation T790M, il est possible de proposer un traitement par osimertinib, ITK EGFR de troisième génération actif sur cette altération. Le taux de réponse tumorale attendu dans cette indication est alors d'environ 60% (Jänne *et al.* 2015). La transformation en cancer bronchique à petites cellules, nécessite quant à elle, l'initiation d'une chimiothérapie adaptée à ce type histologique (Sequist *et al.* 2011). La recherche du mécanisme de résistance est donc un élément fondamental dans la prise en charge de la progression sous ITK EGFR. La recherche de la mutation T790M sur l'ADN tumoral circulant dans le plasma de patients progressant sous ITK EGFR, est ainsi recommandée en première intention. En cas de négativité, une nouvelle biopsie tumorale doit être systématiquement envisagée, lorsque

cela est possible (Novello *et al.* 2016). En l'absence de mécanisme de résistance accessible à un traitement spécifique, la seule stratégie validée actuellement est la chimiothérapie à base de sels de platine.

6) Le récepteur MET dans la résistance aux inhibiteurs d'EGFR

Le récepteur MET est impliqué dans la résistance aux ITK EGFR dans les CBNPC EGFR mutés à travers deux mécanismes de dérégulation : la sécrétion de son ligand l'HGF d'une part et son amplification génique d'autre part. Concernant la sécrétion d'HGF, il a été montré dans des modèles pré-cliniques *in vitro* et *in vivo* que l'activation de MET par l'HGF permettait d'induire une résistance aux ITK EGFR en maintenant actives les voies de signalisation MAPK/AKT et PI3K/AKT *via* la phosphorylation de GAB1 (Yano *et al.* 2008; Turke *et al.* 2010). Par ailleurs, il a été mis en évidence une forte expression d'HGF chez 60% des patients présentant une résistance acquise à l'ITK EGFR et 24% des patients présentant une résistance primaire (Yano *et al.* 2011).

Concernant l'amplification de *MET*, il a été montré que cette altération engendre un maintien de l'activation de la voie PI3K/AKT *via* la phosphorylation de ERBB3 malgré le traitement par ITK EGFR et conduit à la progression tumorale (Engelman *et al.* 2007). Plusieurs études portant sur des cohortes de patients rebiopsiés ont permis d'estimer que l'amplification de *MET* (mise en évidence par FISH, PCR, ou CGH) est impliquée dans 5 à 22% des cas de résistance aux ITK EGFR de première génération (Tableau 2). Cependant, compte tenu du faible nombre de patients présentant une amplification de *MET* dans ces études, les caractéristiques cliniques et le pronostic de ces patients restent encore mal connus. Par ailleurs, si des données précliniques montrent qu'un traitement associant un inhibiteur de MET à l'ITK EGFR permet de surmonter la résistance *in vitro* et *in vivo*, l'attitude thérapeutique à adopter chez les patients avec une amplification de *MET* à la résistance au ITK EGFR n'est pas encore définie. En effet, seuls quelques cas isolés de patients progressant sous ITK EGFR avec une amplification de *MET* traités par inhibiteur de MET ont jusqu'à maintenant été rapportés (Yoshimura *et al.* 2017; Ou, Agarwal, and Ali 2016; Y. Q. Li *et al.* 2017). Les conséquences de l'amplification de *MET* sur le phénotype tumoral et le pronostic des patients atteints d'un CBNPC EGFR muté lors de la résistance au ITK EGFR sont encore inconnues.

Tableau 2 : Etudes évaluant la fréquence de l'amplification de *MET* lors la résistance aux ITK EGFR dans les CBNPC EGFR mutés.

Auteurs	Nombre de patients rebiopsiés	Méthodologie	Nombre de patients chez qui l'amplification de <i>MET</i> a été recherchée	Nombre de patients EGFR mutés <i>MET</i> amplifiés à la résistance	Fréquence
(Bean <i>et al.</i> 2007)	43	rétrospective	43	9	21%
(Engelman <i>et al.</i> 2007)	18	rétrospective	18	4	22%
(Arcila <i>et al.</i> 2011)	121	prospective	37	4	11%
(Sequist <i>et al.</i> 2011)	37	rétrospective	37	2	5%
(Oxnard <i>et al.</i> 2013)	93	prospective	38	4	11%
(H. A. Yu <i>et al.</i> 2013)	155	prospective	75	4	5%
(Ji <i>et al.</i> 2013)	26	rétrospective	26	3	12%
(Noro <i>et al.</i> 2015)	9	Non précisée	9	1	10%

III. Objectifs

La dérégulation de la voie HGF/MET représente une cible thérapeutique majeure dans la prise en charge des CBNPC.

Dans le contexte des CBNPC avec mutation EGFR, l'activation de MET est actuellement considérée comme un simple moyen de maintenir la prolifération cellulaire en présence de l'ITK EGFR. Les conséquences de la survenue d'une amplification de *MET*, comme mécanisme de résistance à l'ITK EGFR, tant sur le phénotype tumoral que sur le pronostic des patients sont inconnues. Or le récepteur MET est impliqué dans de nombreux processus biologiques pouvant favoriser l'agressivité tumorale. Les objectifs de ce travail sont :

- de décrire dans une étude clinique de cohorte rétrospective les caractéristiques cliniques et le pronostic de patients présentant un CBNPC EGFR muté résistant aux ITK EGFR avec une amplification de *MET* ou une forte surexpression de MET (Article 1 : *Outcome of EGFR-mutated NSCLC patients with MET-driven resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors*).
- de déterminer par une étude pré-clinique si la survenue d'une amplification de *MET* dans une lignée de CBNPC EGFR-muté, induit au niveau cellulaire un phénotype tumoral plus agressif (Article 2 : *Resistance through MET amplification in EGFR mutated NSCLC promotes epithelium to mesenchyme transition and metastasis*).

Dans le contexte des CBNPC avec mutation des sites d'épissage de l'exon 14 de MET récemment décrits, le ciblage thérapeutique de MET semble particulièrement encourageant. Plusieurs cas de réponse aux inhibiteurs de MET, chez des patients atteints de CBNPC et présentant de telles altérations ont de plus été décrits. La physiopathologie et les conséquences fonctionnelles de ces mutations sont toutefois très différentes des mutations survenant dans le domaine kinase des RTK. Une synthèse de la littérature concernant ces altérations a donc été réalisée au cours de ce travail de thèse (Article 3 : *Les mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de MET*).

TRAVAUX PERSONNELS

Article 1 : Outcome of EGFR-mutated NSCLC patients with MET-driven resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors

Simon Baldacci^{1,15}, Julien Mazieres², Pascale Tomasini³, Nicolas Girard⁴, Florian Guisier⁵, Clarisse Audigier-Valette⁶, Isabelle Monnet⁷, Marie Wislez⁸, Maurice Pérol⁹, Pascal Dô¹⁰, Eric Dansin¹¹, Charlotte Leduc¹², Etienne Giroux Leprieur¹³, Denis Moro-Sibilot¹⁴, David Tulasne¹⁵, Zoulika Kherrouche^{1,15}, Julien Labreuche¹⁶, Alexis B. Cortot^{1,15}

¹CHU Lille, Thoracic Oncology Department, Univ. Lille, Siric ONCOLille, F-59000, Lille, France.

²Toulouse University Hospital, Université Paul Sabatier, Toulouse, France.

³ Aix-Marseille University, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Multidisciplinary Oncology & Therapeutic Innovations dpt. Marseille, France.

⁴Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

⁵Rouen University Hospital, Thoracic oncology unit & Normandy University, IRIB, LITIS Lab, EA 4103 QuantIF team, Rouen, France.

⁶Service de pneumologie, Centre Hospitalier Sainte Musse, Toulon, France.

⁷Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Créteil, France.

⁸Pulmonary Medicine Unit, AP-HP, GH HUEP, Hôpital Tenon, GRC n°04, Theranoscan, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 Paris, France.

⁹Department of Medical Oncology, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

¹⁰Centre Régional de Lutte Contre le Cancer François Baclesse, Caen, France.

¹¹Centre Oscar Lambret, Lille, France.

¹²CHU Strasbourg, Strasbourg, France.

¹³APHP – Hôpital Ambroise Paré, Boulogne-Billancourt, France.

¹⁴Unité d'oncologie thoracique, Service de Pneumologie, CHU Grenoble-Alpes, France.

¹⁵ Univ. Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161 - M3T - Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, F-59000 Lille, France.

¹⁶EA 2694 University of Lille, Lille, France.

Corresponding author :

Alexis B. Cortot

CHU Lille, Thoracic Oncology Department, Boulevard du Professeur Leclercq, 59037, Lille, France.

Tel number : +33 3 20 44 49 98

Fax number : +33 3 20 44 56 11

Email address : alexis.cortot@chru-lille.fr

Key words : Non small cell lung cancer, EGFR, tyrosine kinase inhibitors, resistance, MET

Number of figures : 3

Number of tables : 5

Etude des caractéristiques cliniques et du pronostic des patients atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules EGFR muté résistant aux inhibiteurs de tyrosine kinase d'EGFR avec une surexpression ou une amplification de *MET*

Contexte :

Plusieurs mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) de l'EGFR ont été décrits, comme la mutation T790M ou l'amplification de *MET*. Alors que la mutation T790M est associée à une meilleure survie et une sensibilité aux ITK EGFR de troisième génération, peu de données sont disponibles sur les caractéristiques et le pronostic des patients présentant une résistance ITK EGFR secondaire à la surexpression ou à l'amplification de *MET*.

Méthodes

Les patients issus de 15 centres avec un CBNPC EGFR muté métastatique, présentant une forte surexpression de *MET* en immunohistochimie (score 3+) ou une amplification de *MET* en FISH sur une re-biopsie réalisée après la progression sous TKI EGFR ont été inclus dans cette étude. Les données cliniques et moléculaires ont été analysées rétrospectivement.

Résultats

Quarante deux patients ont été inclus. L'âge médian était de 65 ans. Une majorité de patients était des femmes (67%) et des non fumeurs (71%). Plus de 90% des mutations EGFR détectées sur la biopsie initiale étaient des délétions de l'exon 19 ou des substitutions L858R. Les médianes de survie globale et de survie post-progression sous TKI EGFR étaient respectivement de 36,2 mois [IC95% 27,3-66,5] et de 18,5 mois [IC95% 10,6-27,4] pour l'ensemble des patients inclus. 19 des 36 patients ayant eu une FISH sur la rebiopsie réalisée après progression sous TKI EGFR présentaient une amplification de *MET*. Une mutation T790M a été retrouvée chez 11 patients après l'initiation du TKI EGFR. Un traitement par inhibiteur de *MET* a été initié chez 19 patients. Une seule réponse objective a été observée parmi les 12 patients évaluable traités par inhibiteur de *MET* en monothérapie, et une autre parmi les 2 patients évaluable traités par un inhibiteur de *MET* associé à un inhibiteur d'EGFR.

Conclusion

Les caractéristiques cliniques et le pronostic des patients atteints d'un CBNPC EGFR muté résistant aux ITK EGFR avec une surexpression ou une amplification de *MET* sont comparables à celles de l'ensemble des CBNPC EGFR mutés. Le traitement de ces patients par inhibiteur de *MET* en monothérapie est peu efficace avec un faible taux de réponse tumorale. La détection d'une surexpression de *MET* ou d'une amplification de *MET* n'est pas exclusive de la mutation T790M.

Abstract

Background

Several mechanisms of acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in EGFR-mutated NSCLC have been described including the T790M mutation and *MET* amplification. Whereas T790M mutation confers prolonged survival and sensitivity to 3rd generation TKIs, data are lacking on clinical features and outcome of MET-driven resistant EGFR-mutated NSCLC patients.

Methods

Patients with metastatic EGFR-mutated NSCLC displaying high MET overexpression or *MET* amplification, detected on a biopsy performed after progression on EGFR TKI, were identified in 15 centers. Clinical and molecular data were retrospectively collected.

Results

Forty two patients were included. The median overall survival (OS), and the median post EGFR TKI progression overall survival (PPOS) were 36.2 months [95%CI 27.3-66.5] and 18.5 months [95%CI 10.6-27.4] respectively. Nineteen out of 36 tumors tested for MET FISH had *MET* amplification. A T790M mutation was found in 11/41 (26.8%) patients. T790M-positive patients had a better OS than T790M-negative patients (p=0.0224). Nineteen patients received a MET TKI. Objective response was reported in 1 out of 12 evaluable patients treated with a MET inhibitor as a single agent and in 1 of 2 patients treated with a combination of MET and EGFR TKIs.

Conclusion

MET-driven resistance to EGFR TKI defines a specific pattern of resistance characterized by low objective response rate to MET inhibitors given alone and overlapping with T790M mutations. Further studies are warranted to define adequate therapeutic strategies for MET-driven resistance to EGFR TKI.

Introduction

EGFR mutations are found in 10% of non small cell lung cancer (NSCLC) in Caucasians and 40% in Asians [1]. Treatment of advanced *EGFR*-mutated NSCLC patients relies on *EGFR* tyrosine kinase inhibitors (TKIs), which demonstrated superiority over chemotherapy as first-line therapy [2–5]. However, despite initial efficacy, all the patients will eventually develop resistance to *EGFR* TKIs resulting in tumor progression [6]. The most frequent mechanism of resistance is the T790M mutation, a second *EGFR* mutation that can be successfully targeted with third generation *EGFR* TKIs which have been specifically designed to overcome T790M-driven resistance [7,8]

Besides T790M mutation, bypass activation of other tyrosine kinase receptors including *MET* or *HER2* is the second most common mechanism of resistance to *EGFR* TKI. *MET* amplification leads to overexpression and constitutive activation of the receptor, thus activating the PI3K pathway and bypassing *EGFR* [9]. *MET* amplification has been detected in 5 to 22% of patients with an acquired resistance to *EGFR* TKI [9–14]. *MET* amplification is highly associated with high overexpression of *MET* in NSCLC ($p < 0.001$) [15,16]. Moreover, high *MET* overexpression with a 3+ immunoscore (IHC3+) by immunohistochemistry was recently found in 27% of *EGFR* mutated NSCLC with acquired resistance to *EGFR* TKI [17].

Little data is available about clinical characteristics and outcome of *EGFR*-mutated NSCLC patients with *MET*-driven resistance to *EGFR* TKIs. Moreover, optimal treatment of these patients is still unknown. Preclinical data and case reports suggest that *MET*-amplified *EGFR*-mutated NSCLC are addicted to both *MET* and *EGFR* and that combination of *MET* and *EGFR* TKIs is required to overcome this mechanism of resistance [9,18,19].

Whereas available data and specific treatments emerge for T790M-driven resistance in *EGFR*-mutated NSCLC patients, *MET*-driven resistance is still an unexplored field [20–22]. In the present

study, we report clinical features, outcome and treatment in a series of *EGFR*-mutated NSCLC patients with MET-driven resistance to EGFR TKI.

Results

Clinico-pathological and molecular characteristics

Forty six patients with metastatic NSCLC displaying both *EGFR* mutation and MET overexpression or *MET* gene amplification were retrospectively identified in 15 centers. Four patients were excluded : 3 had only a biopsy performed before EGFR TKI initiation, and 1 had no data available on the treatments received. Forty two patients were included. Re-biopsies of these patients had been performed from May 2011 to May 2016.

Patient clinical characteristics are summarized in Table 1. All 42 patients were diagnosed with metastatic lung adenocarcinoma. Median age was 65.1 years (range 30-82.7). The majority of patients were women (66.7%) and never smokers (70.7%). Most of the *EGFR* mutations detected on the initial biopsy were exon 19 deletions or exon 21 L858R point mutations.

The most frequent site of rebiopsy was the lung and re-biopsies were performed, in 90.5% of the cases, after the Response Evaluation Criteria in Solid Tumor (RECIST) progression on EGFR TKI, which was given as first or second line treatment (supplementary Table 1). The median time between EGFR TKI initiation and re-biopsy was 15.6 months (range 2.1-61.3).

Among the 42 patients included in the study, 36 tumor re-biopsy samples were tested for *MET* FISH and 19 (52.8%) were found *MET* amplified (Figure 1). MET IHC was performed on the re-biopsy of 36 patients and all displayed a high level of MET expression (IHC3+). Six patients had a MET FISH but no MET IHC on their re-biopsy and conversely 6 other patients had MET IHC and no interpretable MET FISH. No difference was found regarding the *MET* amplified status between patients with an EGFR exon 19 deletion or an EGFR exon 21 mutation on the initial biopsy (supplementary table 2). Re-biopsies of 34 patients were tested for the BRAF mutations and none

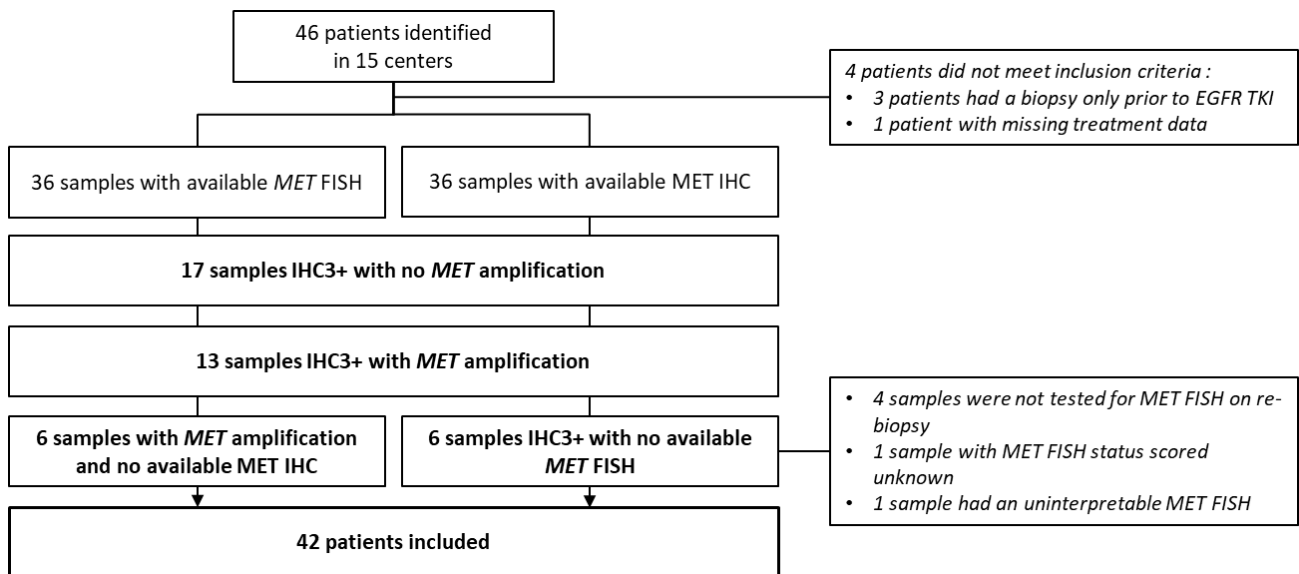
harbored a mutation of this oncogene. Otherwise no histological transformation in small cell lung cancer was reported among the 42 patients of the study.

Table 1 : Patient characteristics. * : range ; ** : 1 exon 20 S768I mutation, 1 association of exon 21 L858R and K860I mutations, 1 association of exon 19 R761Y and exon 18 G719A mutations ; † : one missing data in total population ; TKI : tyrosine kinase inhibitor ; p : p value

	Overall population	MET amplification	MET overexpression no MET amplification	p	T790M+	T790M-	p
	n = 42	n = 19	n = 17		n = 11	n = 30	
Median age (years)	65,1 (30-82,7)*	64,6 (30-74,6)*	65,6 (38,4-82,7)*	0,73	56,9 (45,2-70,3)*	67,4 (30-82,7)*	0,038
Gender				0,35			0,28
Men	14 (33,3%)	5 (26,3%)	7 (41,2%)		2 (18,2%)	12 (40%)	
Women	28 (66,7%)	14 (73,7%)	10 (58,8%)		9 (81,8%)	18 (60%)	
Smoking status†				0,45			1
Never smoker	29 (70,7%)	12 (63,2%)	12 (75%)		8 (72,7%)	20 (69%)	
Former and current smoker	12 (29,3%)	7 (36,8%)	4 (25%)		3 (27,3%)	9 (31%)	
Stade IV	42 (100%)	19 (100%)	17 (100%)		11 (100%)	30 (100%)	
Adenocarcinoma	42 (100%)	19 (100%)	17 (100%)		11 (100%)	30 (100%)	
Initial EGFR mutation				0,59			0,55
Exon 19 deletion or Exon 21 L858R mutation	39 (92,9%)	18 (94,7%)	15 (88,2%)		11 (100%)	27 (90%)	
Other**	3 (7,1%)	1 (5,3%)	2 (11,8%)		0 (0%)	3 (10%)	

Figure 1 : Flow chart of MET overexpression and MET amplification status on post EGFR TKI initiation

sample. IHC : Immunohistochemistry ; FISH : Fluorescence In Situ Hybridization ; TKI : tyrosine kinase inhibitor



Clinical outcome and EGFR TKI treatment characteristics

Characteristics of initial EGFR TKI therapy are shown in Table 2. All patients received a first or second generation EGFR TKI. The overall response rate (ORR) was 82.1%, and the median progression free survival (PFS) was 11.1 months [95%CI 7.6-14.1]. In 73.2% of the cases, tumor progression involved a new lesion. The main site of new metastasis was the lung. 27 patients (66%) developed more than one progressive lesion at EGFR TKI resistance. The median post-progression overall survival (PPOS) and the median overall survival (OS) were respectively 18.5 months [95%CI 10.6-27.4] and 36.2 months [95%CI 27.3-66.5].

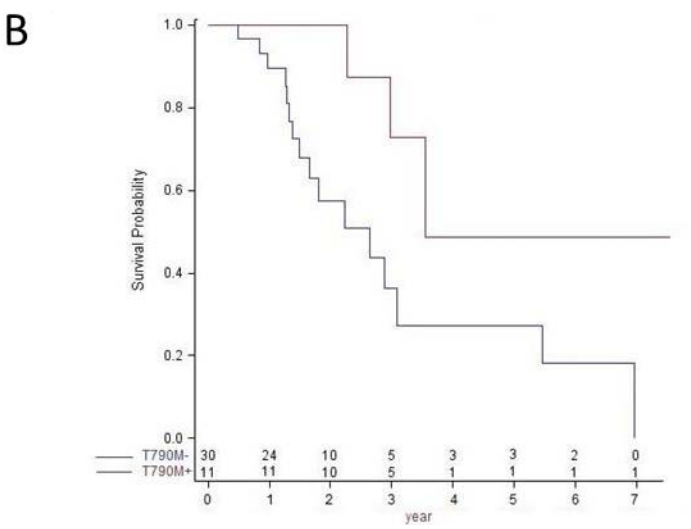
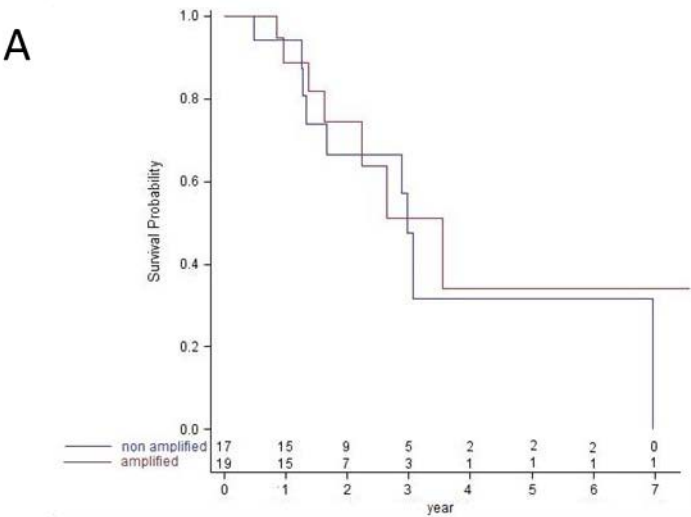
The characteristics of the EGFR TKI therapy were not significantly different according to the MET FISH status. No significant difference was found between patients with MET amplification and those with MET overexpression and no MET amplification in terms of OS (median OS : 42.8 vs. 36.2 months p = 0.69 ; Figure 2A), PPOS (median PPOS : 13.7 vs. 23.8 months p =0.77) and PFS on EGFR TKI (median PFS : 10.5 vs. 10.1 months p = 0.08). There were also no significant differences between the patients with EGFR exon 19 deletion on the initial biopsy and the patients with EGFR exon 21

mutation in terms of OS (median OS : 36.2 vs. 27.3 months $p = 0.33$), PPOS (median PPOS 18.5 vs. 12.6 months $p = 0.91$), and PFS on EGFR TKI (median PFS : 11.7 vs. 9.2 months $p = 0.56$). Of note only one patient with an EGFR exon 19 deletion received afatinib, and this drug was not used in patients with EGFR exon 21 mutation (supplementary table 2).

Table 2 : EGFR TKI treatment characteristics. * : range ; TKI :tyrosine kinase inhibitor ; p : p value ; † : 3 missing data ; ‡ : one missing data

	Overall population	MET amplification	MET overexpression no MET amplification	p	T790M+	T790M-	p
	n = 42	n = 19	n = 17		n = 11	n = 30	
First EGFR TKI received				0,49			1
Erlotinib or Gefinitib	40 (95,2%)	17 (89,5%)	17 (100%)		11 (100%)	28 (93,3%)	
Afatinib	2 (4,76%)	2 (10,5%)	0 (0%)		0 (0%)	2 (6,7%)	
Line of the first EGFR TKI therapy				0,81			1
1	29 (69%)	13 (68,4%)	11 (64,7%)		8 (72,7%)	20 (66,7%)	
2	13 (31%)	6 (31,6%)	6 (35,3%)		3 (27,3%)	10 (33,3%)	
Response to the EGFR TKI †				1			0,17
Objective response	32 (82,1%)	14 (77,8%)	12 (80%)		10 (100%)	22 (78,6%)	
Stable disease and Progression	7 (17,9%)	4 (22,2%)	3 (20%)		0 (0%)	6 (21,4%)	
Median duration of TKI EGFR therapy (months)‡	13,1 (1,4-52,5)*	13,8 (4,1-21,6)*	10,2 (1,4-45,4)*	0,61	14,0 (7,7-25)*	10,7 (1,4-52,5)*	0,51
EGFR TKI progression involving a new metastasis ‡	30 (73,2%)	14 (77,8%)	12 (70,6%)	0,71	8 (80%)	22 (73,3%)	1
EGFR TKI progression involving more than one progressive lesion ‡	27 (65.8%)	12 (63.2%)	11 (68.8%)	1	10 (90,9%)	16 (55.2%)	0.065

Figure 2 : Overall survival according to T790M status and *MET* amplification status. A : Kaplan Meier estimates of overall survival in *MET* non amplified (blue) and *MET* amplified (red) patients. B : Kaplan Meier estimates of overall survival in T790M-negative (blue) and T790M-positive (red) patients.



Impact of the T790M mutational status

Eleven among the 41 patients (26.8%) tested for the T790M mutation were T790M positive. In 9 patients, the T790M mutation was detected in the tumor re-biopsy displaying MET overexpression or *MET* amplification. In the remaining 2 patients, the T790M mutation was detected in circulating free DNA in one case and in a tumor biopsy obtained before the re-biopsy displaying MET overexpression and *MET* amplification in another case. Three patients had both *MET* amplification and T790M mutation in the same sample. The T790M-positive patients were significantly younger than T790M-negative patients and the time between EGFR TKI initiation and re-biopsy was significantly longer in T790M positive patients (Table 1 and Supplementary Table 1).

T790M-positive patients had a better OS (median OS 43.1 vs. 32.2 months, $p=0.0224$) than T790M-negative patients (Figure 2B). There was also a trend to a better PPOS in T790M-positive patients compared to the T790M-negative patients although it did not reach statistical significance (median 23.8 vs. 11.0 months, $p=0.075$, supplementary table 3).

Treatment with MET inhibitors and third generation EGFR TKI therapy

Nineteen patients received a MET inhibitor, mostly crizotinib, including 13 *MET*-amplified patients (Table 3). The MET inhibitor was given as a monotherapy in 15 patients and in combination with an EGFR TKI in 4 patients. The MET inhibitor was used as 2nd or 3rd line in most of the cases. Objective response was reported in 1 out of 12 evaluable patients treated with a MET inhibitor as single agent and in 1 out of 2 evaluable patients treated with a combination of MET and EGFR inhibitors (Figure 3A and 3B). The MET inhibitor was stopped because of elevated liver enzymes in 2 patients and diarrhea in one patient. Two of these patients received the MET inhibitor in combination with an EGFR TKI. The median times between re-biopsy and MET inhibitor initiation and first EGFR TKI withdrawal and MET inhibitor initiation were respectively 2.3 months and 3.1 months.

Ten patients received a 3rd generation EGFR TKI (Table 4) mostly osimertinib. Two partial responses were reported among the 5 T790M-positive evaluable patients who were treated following detection of MET overexpression or *MET* amplification. 3 patients were treated with 3rd generation EGFR TKI before they received a MET inhibitor.

Table 3 : MET inhibitor tumor response. *ID : identification number ; IHC : Immunohistochemistry ; PD : progressive disease ; SD : stable disease ; PR : partial response ; TKI : tyrosine kinase inhibitor ; RECIST : response evaluation criteria in solid tumor*

ID	<i>MET</i> amplification	IHC MET 3+	T790M	MET inhibitor	EGFR TKI in combination therapy	Line	RECIST Response	MET inhibitor status	Duration of MET inhibitor (days)
1	-	+	-	crizotinib	gefitinib	2	-	stopped (toxicity)	10
2	+	+	-	crizotinib	-	5	PD	stopped (PD)	37
4	+		-	crizotinib	-	4	-	stopped (patient's decision)	2
5	+		+	crizotinib	-	5	SD	ongoing	107
6	+	+	-	crizotinib	-	2	SD	ongoing	15
7	+	+	-	crizotinib	-	3	PD	stopped (PD)	20
9	+	+	-	crizotinib	-	2	-	stopped (toxicity)	9
10	+	+	-	crizotinib	-	3	PD	stopped (PD)	59
12	-	+	-	other	other	2	SD	ongoing	49
14	+		-	crizotinib	-	2	SD	ongoing	42
18	+		+	crizotinib	-	4	SD	stopped (PD)	111
19	+	+		crizotinib	-	4	PD	stopped (PD)	55
20	-	+	-	other	-	6	SD	stopped (PD)	119
25	+		-	crizotinib	-	2	PR	ongoing	41
32	-	+	-	other	-	3	PD	stopped (PD)	22
37	+	+	-	other	other	3	PR	stopped (PD)	145
42	-	+	-	crizotinib	-	6	SD	stopped (PD)	60
43		+	-	crizotinib	gefitinib	4	-	stopped (toxicity)	28
45	+	+	+	crizotinib	-	4	-	ongoing	15

Figure 3 Duration of treatment with MET inhibitors. A : Patients treated with a MET inhibitor as a single agent ; B : Patients treated with a MET inhibitor in combination with an EGFR TKI. ID :

identification number, Red: progressive disease as best response according to RECIST criteria ; Orange : stable disease as best response according to RECIST criteria ; Green : partial response as best response according to RECIST criteria, White : no tumor response evaluation available ; Arrow indicates that the MET inhibitor therapy is still ongoing.

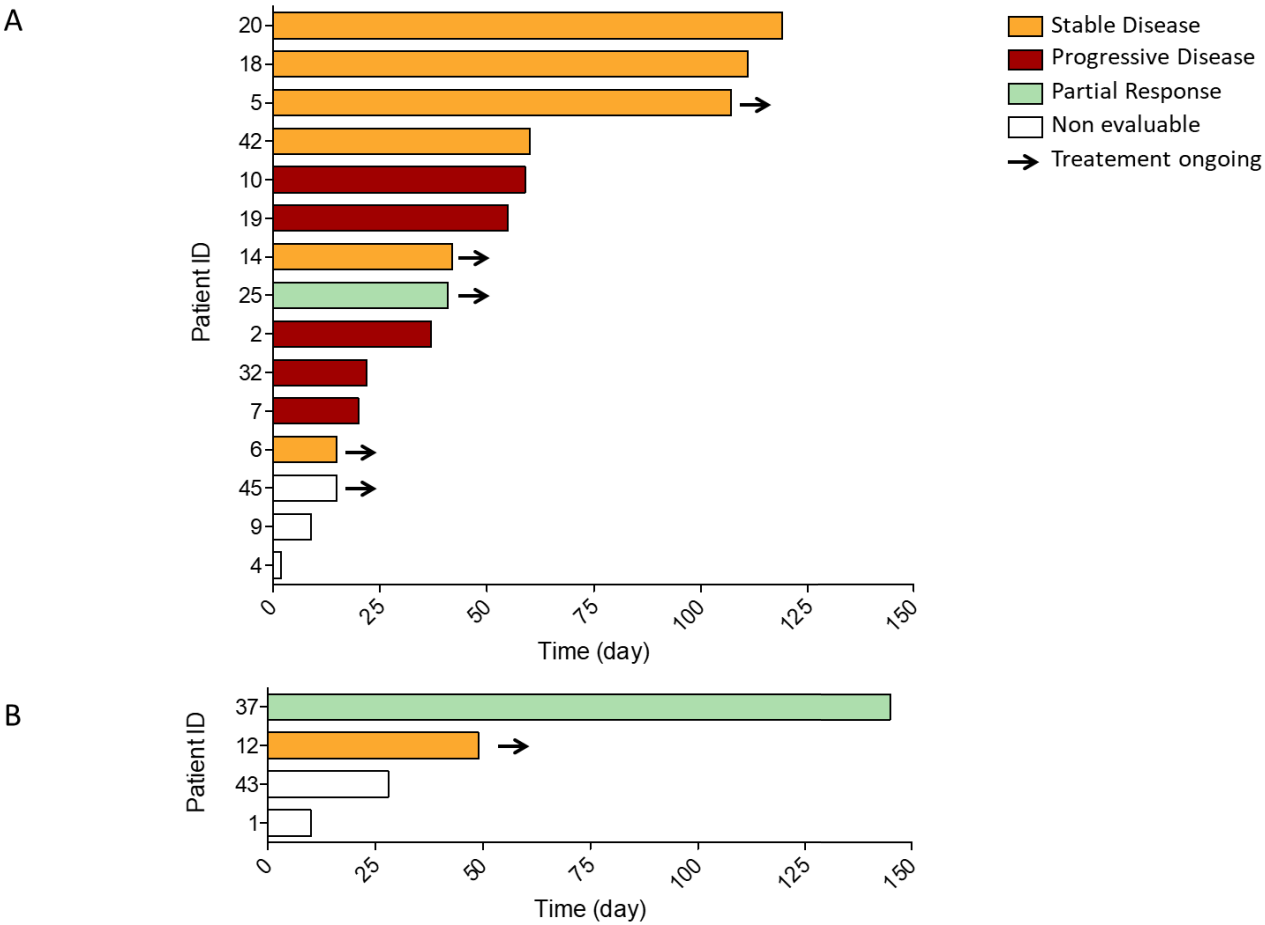


Table 4 : Third generation EGFR TKI tumor response. ID : identification number ; IHC : Immunohistochemistry ; TKI : tyrosine kinase inhibitor ; RECIST : response evaluation criteria in solid tumor ; 3rd G EGFR TKI : Third Generation EGFR TKI

ID	MET amplification	IHC MET 3+	T790M	Re-biopsy performed before 3 rd G EGFR TKI therapy	3 rd G EGFR TKI	Line	RECIST Response	3 rd G EGFR TKI status	Duration of 3 rd G EGFR TKI (days)
5	+		+	+	osimertinib	3	PD	stopped (PD)	48
16	-	+	+	+	other	2	PR	stopped (toxicity)	56
18	+		+	+	osimertinib	5	PD	stopped (PD)	80
20	-	+	-	+	osimertinib	5	PR	stopped (PD)	157
22		+	+	+	osimertinib	2	PR	ongoing	315
26	-	+	+	+	osimertinib	3	PD	stopped (PD)	84
27		+	+	+	osimertinib	4	-	ongoing	15
28	+	+	+	+	osimertinib	2	-	ongoing	18
45	+	+	+	-	osimertinib	3	SD	stopped (PD)	288
46	+	+	+	-	osimertinib	4	PR	ongoing	277

Discussion

Bypass activation of tyrosine kinase receptors is a well described mechanism of resistance to EGFR TKIs in *EGFR*-mutated NSCLC. MET-driven resistance has been reported in up to 22% of patients with acquired resistance to EGFR TKIs [9]. Still, although the biological basis of this mechanism of resistance has been extensively studied, there is very little data on the clinical characteristics and outcome of patients with MET-driven acquired resistance to EGFR TKIs. In this multicenter retrospective study, we report for the first time clinical features, response to MET inhibitors and outcome of 42 metastatic *EGFR*-mutated NSCLC patients with *MET* amplification or *MET* overexpression, as assessed on a post-progression re-biopsy. Because of the very low number of patients with MET-driven resistance to EGFR TKIs, we performed a multicentric retrospective study.

Therefore, we could not perform a central analysis of RECIST responses, *MET* FISH, and MET IHC analysis. The absence of *MET* FISH and MET IHC analysis on the initial biopsy is also challenging. Indeed, we cannot exclude that some patients might have a MET overexpression or a *MET* amplification before EGFR TKI therapy. Most patients with EGFR exon 19 deletions in our study received a first generation EGFR TKI and were not treated with afatinib which is now therapeutic standard for these patients. There were no specific clinical characteristics of the patients included in our study but we observed a low rate of objective response to MET inhibitors when used as a monotherapy and a substantial rate of concomitant T790M mutations, which were still partially associated with efficacy of 3rd generation EGFR TKIs and favorable prognosis, even in association with MET overexpression or *MET* amplification.

In our study, *MET* amplification was defined using the criteria provided by Schildhaus et al. to define high-level *MET* amplification, i.e. as an average *MET* gene copy number (GCN) per cell ≥ 6 or a ratio $MET/CEP7 \geq 2$ or the presence of MET clusters [15]. Indeed these criteria were already widely used across our pathological centers to define positive *MET* FISH. However, many other definitions of *MET* amplification based on FISH have been proposed based on various thresholds for $MET/CEP7$ ratio or mean *MET* GNC [21,23–27]. Unlike the mean *MET* GNC, the ratio $MET/CEP7$ is thought to discriminate real amplification from polysomia. Recent data showed that a $MET/CEP7$ ratio >5 was able to discriminate lung adenocarcinoma with no other driver mutations and was associated with high objective response rate to crizotinib [27,28]. However, the right definition of a positive FISH that would allow identification of *MET* gene amplification remains to be determined. The ability to detect *MET* amplification through next generation sequencing may favor routine screening and harmonization of the definition of *MET* amplification.

In our study, *EGFR* mutated NSCLC patients with either *MET* amplification or MET overexpression (MET IHC3+) were included. In lung adenocarcinoma, *MET* amplification is significantly associated with IHC3+ MET overexpression [16]. In our study, all the patients with a *MET* amplification who also underwent a MET IHC were scored 3+. MET overexpression, regardless *MET*

amplification status, has been found to induce addiction to the MET pathway, and was recently found in 27.1% of *EGFR* mutated NSCLC with acquired resistance to EGFR TKI [29] [17]. Moreover, an ongoing clinical trial evaluating the efficacy of combining MET and EGFR TKIs in *EGFR*-mutated NSCLC patients with MET-driven resistance to EGFR TKIs includes patients with both *MET* amplification or MET overexpression (NCT01610336). In patients without *MET* amplification, the cause of MET overexpression at the time of re-biopsy may involve other molecular alterations including MET exon 14 splicing sites mutations which have been reported to be associated with MET overexpression [30] and may be involved in resistance to EGFR TKI [31]. Because of the unavailability of most of the tumor samples, we could not test for other genomic alterations.

In our cohort, metastatic *EGFR* mutated NSCLC with a MET-driven resistance to EGFR TKI did not display specific clinical features compared to those observed in previous studies. Median PPOS (18.5 months) was also in the range of what has been reported in previous studies focusing on patients with acquired resistance to EGFR TKIs (14.3-20 months) [13,32,33]. Moreover, although *MET* GCN alterations and MET overexpression have been associated with poor prognosis in resected NSCLC [34,35], we did not find poor outcome for the patients included in our study. These findings suggest that the prognostic impact of MET activation might depend on the stage of the disease and on the oncogenic environment. We observed only one objective response out of 12 patients treated with MET inhibitor monotherapy. In preclinical models, a double inhibition of EGFR and MET pathways was required to overcome MET driven resistance to EGFR TKI [9,36]. Cases of *EGFR* mutated *MET* amplified NSCLC responding to combined MET and EGFR TKIs have been reported [18,19]. This dual inhibition approach is currently evaluated in several phase I/II clinical trials in this setting using various EGFR (gefitinib, erlotinib, EGF816, osimertinib) and MET (capmatinib, volitinib, tepotinib) TKIs (NCT02468661, NCT01610336, NCT02335944, NCT02374645, NCT02143466, NCT01982955). Preliminary results from a phase II study, evaluating the combination of capmatinib and gefitinib in *EGFR* mutated NSCLC patients who progressed on EGFR TKI, reported an ORR of 19%

in patients with MET IHC3+ or MET IHC≥2+ and *MET* GCN≥5 and raised to 30% in the subgroup of patients with *MET* GCN≥6 [37].

In our study, 11 patients were T790M positive. Three had both a *MET* amplification and a T790M mutation on the same sample. The coexistence of these mechanisms of resistance has been previously described [10]. Compared to the T790M negative, the T790M positive patients in our study had a better OS and a trend to a better PPOS. Several studies reported that, amongst patients with EGFR TKI acquired resistance, T790M-positive patients had a better PPOS than T790M-negative patients [13,32,38]. However, none of these studies evaluated the impact of concomitant *MET* amplification and overexpression. Of note, Gou *et al.* found that patients with a T790M mutation and *MET* overexpression had a worse PPOS than patients with only *MET* overexpression or the T790M mutation alone. This discrepancy with our results might be due to the small size of both cohorts, and variations in the characteristics of the study population (higher rate of never smokers and caucasians in our study). We cannot also exclude the influence of confounding factors such as the younger age and the use of 3rd generation EGFR TKI in T790M positive patients. Indeed in our study, 9 T790M-positive patients received a 3rd generation EGFR TKI and 3 partial responses were achieved. Very few data are available regarding the efficacy of 3rd generation TKIs in the context of multiple resistance mechanisms. Our results suggest that 3rd generation TKIs may retain activity against T790M-positive tumors in some patients, even in the presence of *MET* activation, which may be due to the spatial heterogeneity of resistance mechanisms rather than co-existence of 2 resistance mechanisms in the same tumor cells.

Finally, *MET*-driven resistance to EGFR TKI defines a specific pattern of resistance characterized by low objective response rate to *MET* TKIs given alone and overlapping with T790M mutations. Even when associated with *MET* dysregulation, the T790M mutation was still associated with relative efficacy of 3rd generation EGFR TKIs and prolonged survival. Further studies are warranted to define adequate therapeutic strategies for *MET*-driven resistance to EGFR TKI.

Materials and Methods

Patients

We constituted a multicenter retrospective observational cohort of patients identified among 15 French centers. Inclusion criteria were documented diagnosis of metastatic NSCLC, detection of an *EGFR* mutation on tumor sample at diagnosis, treatment with at least one EGFR TKI and detection of MET overexpression or *MET* amplification after the time of clinical or radiological progression on EGFR TKI. Post-progression re-biopsy and MET status assessment were routinely performed in participating centers during the study period. Clinical and pathological data were retrospectively collected in each center for all included patients. Best overall response, defined as the best response from the start of treatment until disease progression, was assessed by investigators from available follow-up exams in each center using Response Evaluation Criteria in Solid Tumor (RECIST) v1.1. Crizotinib, gefinitib, and osimertinib were respectively prescribed with the following doses and schedules : 250mg bid, 250mg daily, 80mg daily. The study was approved by a national ethic committee (CEPRO 2016-001).

Histological and molecular analyses

Histological and molecular analyses of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples were prospectively assessed by local pathologists in accredited and quality controlled laboratories, as part of the routine procedure. MET immunohistochemistry and *MET* FISH analyses were realized according to locally certified and nationally approved procedures. MET overexpression was defined as a 3+ MET Immunoscore ($\geq 50\%$ of tumor cells showing high-intensity staining) on MET immunohistochemistry using MET monoclonal antibody (clone SP44 Ventana). *MET* amplification was defined by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) as a mean *MET* GNC per cell ≥ 6 , or a Ratio MET/CEP7 ≥ 2 , or the presence of MET clusters [15]. Patients were considered “T790M positive” if an *EGFR* T790M mutation was detected in post-progression circulating tumor DNA, on the re-biopsy on

which MET overexpression or *MET* amplification was found, or on a tumor sample collected before the re-biopsy.

Statistical analyses

Categorical variables are expressed as frequencies and percentages. Quantitative variables are expressed as medians (range). Normality of distribution was assessed graphically and by using the Shapiro–Wilk test. Bivariate analyses were realized to assess the sub-group comparability (*MET* amplified vs. *MET* non-amplified and T790M+ vs. T790M-). Chi-Squared tests or Fisher’s exact test (when expected cell frequency <5) were used to study the association between categorical variables and different groups. A Mann-Whitney U test was used to compare age, time between EGFR TKI initiation and rebiopsy, and duration of TKI EGFR therapy between groups. We estimated and compared overall survival (OS), post progression overall survival (PPOS) and progression free survival (PFS) between the study groups (*MET* amplified vs. *MET* non amplified and T790M+ vs. T790M-) using the Kaplan-Meier Method and log-rank test. OS was measured from the date of metastatic NSCLC diagnosis to the date of death from any cause or last follow-up. The PPOS was measured as the time from EGFR TKI RECIST progression to death from any cause. The PFS was defined as the time from treatment start to disease progression or death from any cause. Objective response rate (ORR) was defined as the percentage of patients with partial or complete response to the indicated treatment. Statistical testing was conducted at the 2-tailed α level of 0.05. Data were analyzed with SAS software version 9.3 (SAS Institute, Cary, NC).

Abbreviations

Non small cell lung cancer (NSCLC), Tyrosine kinase inhibitor (TKI), overall survival (OS), post progression overall survival (PPOS), progression free survival (PFS), objective response rate (ORR), response evaluation criteria in solid tumor (RECIST), gene copy number (GNC),

immunohistochemistry (IHC), formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE), Fluorescence In Situ Hybridization (FISH).

Acknowledgement

This work was supported by grants from the SIRIC ONCOLille, the Fondation du Souffle, and the Fonds de Dotation Recherche en Santé Respiratoire. The authors are grateful to Ms Maeva Kyheng of the biostatistics unit of Lille University Hospital for her assistance regarding the statistical analysis, and Mr Eric Wasielewski for his support regarding the administrative procedure of the protocol approval.

Funding

This work was supported by grants from the SIRIC ONCOLille, the Fondation du Souffle, and the Fond de Dotation Recherche en Santé Respiratoire.

REFERENCES

1. Barlesi F, Mazieres J, Merlio JP, Debieuvre D, Mosser J, Lena H, Ouafik L, Besse B, Rouquette I, Westeel V, Escande F, Monnet I, Lemoine A, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet Lond Engl*. 2016; 387: 1415–26. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00004-0.
2. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009; 361: 947–57. doi: 10.1056/NEJMoa0810699.
3. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Okinaga S, Hirano H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*. 2010; 362: 2380–8. doi: 10.1056/NEJMoa0909530.
4. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Palmero R, Garcia Gomez R, Pallares C, Sanchez JM, Porta R, Cobo M, Garrido P, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012; 13: 239–46. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70393-X.
5. Sequist LV, Yang JCH, Yamamoto N, O’Byrne K, Hirsh V, Mok T, Geater SL, Orlov S, Tsai CM, Boyer M, Su WC, Bannouna J, Kato T, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013; 31: 3327–34. doi: 10.1200/JCO.2012.44.2806.
6. Cortot AB, Jänne PA. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc*. 2014; 23: 356–66. doi: 10.1183/09059180.00004614.
7. Zhou W, Ercan D, Chen L, Yun CH, Li D, Capelletti M, Cortot AB, Chirieac L, Iacob RE, Padera R, Engen JR, Wong KK, Eck MJ, et al. Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M. *Nature*. 2009; 462: 1070–4. doi: 10.1038/nature08622.
8. Jänne PA, Yang JCH, Kim DW, Planchard D, Ohe Y, Ramalingam SS, Ahn MJ, Kim SW, Su WC, Horn L, Haggstrom D, Felip E, Kim JH, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015; 372: 1689–99. doi: 10.1056/NEJMoa1411817.
9. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*. 2007; 316: 1039–43. doi: 10.1126/science.1141478.
10. Bean J, Brennan C, Shih JY, Riely G, Viale A, Wang L, Chitale D, Motoi N, Szoke J, Broderick S, Balak M, Chang WC, Yu CJ, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 20932–7. doi: 10.1073/pnas.0710370104.

11. Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, Riely GJ, Solomon SB, Zakowski MF, Kris MG, Pao W, Miller VA, Ladanyi M. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2011; 17: 1169–80. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2277.
12. Sequist LV, Waltman BA, Dias Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, Bergethon K, Shaw AT, Gettinger S, Cosper AK, Akhavanfard S, Heist RS, Temel J, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med.* 2011; 3: 75ra26. doi: 10.1126/scitranslmed.3002003.
13. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, Kris MG, Miller VA, Ladanyi M, Riely GJ. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013; 19: 2240–7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2246.
14. Noro R, Seike M, Zou F, Soeno C, Matsuda K, Sugano T, Nishijima N, Matsumoto M, Kitamura K, Kosaihiro S, Minegishi Y, Yoshimura A, Kubota K, et al. MET FISH-positive status predicts short progression-free survival and overall survival after gefitinib treatment in lung adenocarcinoma with EGFR mutation. *BMC Cancer.* 2015; 15: 31. doi: 10.1186/s12885-015-1019-1.
15. Schildhaus HU, Schultheis AM, Rüschoff J, Binot E, Merkelbach Bruse S, Fassunke J, Schulte W, Ko YD, Schlesinger A, Bos M, Gardizi M, Engel Riedel W, Brockmann M, et al. MET amplification status in therapy-naïve adeno- and squamous cell carcinomas of the lung. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2015; 21: 907–15. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0450.
16. Park S, Koh J, Kim DW, Kim M, Keam B, Kim TM, Jeon YK, Chung DH, Heo DS. MET amplification, protein expression, and mutations in pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer Amst Neth.* 2015; 90: 381–7. doi: 10.1016/j.lungcan.2015.10.022.
17. Gou LY, Li AN, Yang JJ, Zhang XC, Su J, Yan HH, Xie Z, Lou NN, Liu SY, Dong ZY, Gao HF, Zhou Q, Zhong WZ, et al. The coexistence of MET over-expression and an EGFR T790M mutation is related to acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2016; . doi: 10.18632/oncotarget.9697.
18. Gainor JF, Niederst MJ, Lennerz JK, Dagogo-Jack I, Stevens S, Shaw AT, Sequist LV, Engelman JA. Dramatic Response to Combination Erlotinib and Crizotinib in a Patient with Advanced, EGFR-Mutant Lung Cancer Harboring De Novo MET Amplification. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2016; 11: e83-85. doi: 10.1016/j.jtho.2016.02.021.
19. Bahcall M, Sim T, Paweletz CP, Patel JD, Alden RS, Kuang Y, Sacher AG, Kim ND, Lydon C, Awad MM, Jaklitsch MT, Sholl LM, Jänne PA, et al. Acquired MET D1228V Mutation and Resistance to MET Inhibition in Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2016; . doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0686.
20. Tanaka A, Sueoka-Aragane N, Nakamura T, Takeda Y, Mitsuoka M, Yamasaki F, Hayashi S, Sueoka E, Kimura S. Co-existence of positive MET FISH status with EGFR mutations signifies poor prognosis in lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer Amst Neth.* 2012; 75: 89–94. doi: 10.1016/j.lungcan.2011.06.004.
21. Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, Rossi E, Gajapathy S, Felicioni L, Del Grammastro M, Sciarrotta MG, Buttitta F, Incarbone M, Toschi L, Finocchiaro G, Destro A, et al. Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer

- patients. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009; 27: 1667–74. doi: 10.1200/JCO.2008.19.1635.
22. Cappuzzo F, Jänne PA, Skokan M, Finocchiaro G, Rossi E, Ligorio C, Zucali PA, Terracciano L, Toschi L, Roncalli M, Destro A, Incarbone M, Alloisio M, et al. MET increased gene copy number and primary resistance to gefitinib therapy in non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2009; 20: 298–304. doi: 10.1093/annonc/mdn635.
 23. Kris MG, Johnson BE, Berry LD, Kwiatkowski DJ, Iafrate AJ, Wistuba II, Varella-Garcia M, Franklin WA, Aronson SL, Su PF, Shyr Y, Camidge DR, Sequist LV, et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA*. 2014; 311: 1998–2006. doi: 10.1001/jama.2014.3741.
 24. Casadevall D, Gimeno J, Clavé S, Taus Á, Pijuan L, Arumí M, Lorenzo M, Menéndez S, Cañadas I, Albanell J, Serrano S, Espinet B, Salido M, et al. MET expression and copy number heterogeneity in nonsquamous non-small cell lung cancer (nsNSCLC). *Oncotarget*. 2015; 6: 16215–26. doi: 10.18632/oncotarget.3976.
 25. Watermann I, Schmitt B, Stellmacher F, Müller J, Gaber R, Kugler C, Reinmuth N, Huber RM, Thomas M, Zabel P, Rabe KF, Jonigk D, Warth A, et al. Improved diagnostics targeting c-MET in non-small cell lung cancer: expression, amplification and activation? *Diagn Pathol*. 2015; 10: 130. doi: 10.1186/s13000-015-0362-5.
 26. Beau-Faller M, Ruppert AM, Voegeli AC, Neuville A, Meyer N, Guerin E, Legrain M, Mennecier B, Wihlm JM, Massard G, Quoix E, Oudet P, Gaub MP. MET gene copy number in non-small cell lung cancer: molecular analysis in a targeted tyrosine kinase inhibitor naïve cohort. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2008; 3: 331–9. doi: 10.1097/JTO.0b013e318168d9d4.
 27. Camidge DR, Ou SHI, Shapiro G, Otterson GA, Villaruz LC, Villalona-Calero MA, Iafrate AJ, Varella Garcia M, Dacic S, Cardarella S, Zhao W, Tye L, Stephenson P, et al. Efficacy and safety of crizotinib in patients with advanced c-MET-amplified non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol [Internet]*. 2014 [cited 2016 Nov 13]; 32:5s. Available from <http://meetinglibrary.asco.org/content/132030-144>
 28. Noonan SA, Berry L, Lu X, Gao D, Barón AE, Chesnut P, Sheren J, Aisner DL, Merrick D, Doebele RC, Varella-Garcia M, Camidge DR. Identifying the Appropriate FISH Criteria for Defining MET Copy Number-Driven Lung Adenocarcinoma through Oncogene Overlap Analysis. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2016; 11: 1293–304. doi: 10.1016/j.jtho.2016.04.033.
 29. Kryeziu K, Pirker C, Engliger B, van Schoonhoven S, Spitzwieser M, Mohr T, Körner W, Weinmüllner R, Tav K, Grillari J, others. Chronic arsenic trioxide exposure leads to enhanced aggressiveness via Met oncogene addiction in cancer cells. *Oncotarget*. 2016; 7: 27379.
 30. Tong JH, Yeung SF, Chan AWH, Chung LY, Chau SL, Lung RWM, Tong CY, Chow C, Tin EKY, Yu YH, Li H, Pan Y, Chak WP, et al. MET Amplification and Exon 14 Splice Site Mutation Define Unique Molecular Subgroups of Non-Small Cell Lung Carcinoma with Poor Prognosis. *Clin Cancer Res*. 2016; 22: 3048–56. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2061.
 31. Lee J, Ou SHI, Lee JM, Kim HC, Hong M, Kim SY, Jang J, Ahn S, Kang SY, Lee S, Kim ST, Kim B, Choi J, et al. Gastrointestinal malignancies harbor actionable MET exon 14 deletions. *Oncotarget*. 2015; 6: 28211–22. doi: 10.18632/oncotarget.4721.

32. Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS, Riely GJ, Chmielecki J, Kris MG, Pao W, Ladanyi M, Miller VA. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011; 17: 1616–22. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2692.
33. Sun JM, Ahn MJ, Choi YL, Ahn JS, Park K. Clinical implications of T790M mutation in patients with acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Lung Cancer Amst Neth*. 2013; 82: 294–8. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.08.023.
34. Dimou A, Non L, Chae YK, Tester WJ, Syrigos KN. MET gene copy number predicts worse overall survival in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC); a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014; 9: e107677. doi: 10.1371/journal.pone.0107677.
35. Guo B, Cen H, Tan X, Liu W, Ke Q. Prognostic value of MET gene copy number and protein expression in patients with surgically resected non-small cell lung cancer: a meta-analysis of published literatures. *PLoS One*. 2014; 9: e99399. doi: 10.1371/journal.pone.0099399.
36. Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E, Toschi L, Rogers A, Mok T, Sequist L, Lindeman NI, Murphy C, Akhavanfard S, et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell*. 2010; 17: 77–88. doi: 10.1016/j.ccr.2009.11.022.
37. Wu YL, Kim DW, Felip E, Zhang L, Liu X, Zhou CC, Lee DH, Han JY, Krohn A, Leboteiller R, Xu C, Squires M, Akimov M, et al. Phase (Ph) II safety and efficacy results of a single-arm phase II study of capmatinib (INC280) + gefitinib in patients (pts) with EGFR-mutated (mut), cMET-positive (cMET+) non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol [Internet]*. 2016 [cited 2016 Nov 16]; 34. Available from <http://meetinglibrary.asco.org/content/165978-176>
38. Hata A, Katakami N, Yoshioka H, Takeshita J, Tanaka K, Nanjo S, Fujita S, Kaji R, Imai Y, Monden K, Matsumoto T, Nagata K, Otsuka K, et al. Rebiopsy of non-small cell lung cancer patients with acquired resistance to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor: Comparison between T790M mutation-positive and mutation-negative populations. *Cancer*. 2013; 119: 4325–32. doi: 10.1002/cncr.28364.

Supplementary table 1 : Re-biopsy characteristics. * : range ; † : one missing data in total population ; TKI : tyrosine kinase inhibitor ; p : p value

	Overall population	MET amplification	MET overexpression no MET amplification	p	T790M+	T790M-	p
	n = 42	n = 19	n = 17		n = 11	n = 30	
Re-biopsy obtained after EGFR TKI RECIST progression	38 (90,5%)	15 (78,9%)	17 (100%)	0,11	10 (90,9%)	27 (90%)	1
Number of lines ongoing or over at the time of re-biopsy				1			1
≤2	37 (88,1%)	17 (89,5%)	15 (88,2%)		10 (90,9%)	26 (86,7%)	
≥3	5 (11,9%)	2 (10,5%)	2 (11,8%)		1 (9,1%)	4 (13,3%)	
Median time between re-biopsy and EGFR TKI initiation (months)	15,6 (2,1-61,3)*	14,1 (3,6-31,8)*	20,7 (2,1-31,3)*	0,39	22,1 (9,1-36)*	12,1 (2,1-61,3)*	0,050
Re-biopsy obtained while TKI EGFR is still ongoing†	28 (68,3%)	15 (79,0%)	9 (56,3%)	0,15	5 (50%)	23 (76,7%)	0,13
Re-biopsy site							
Lung	23(54,8%)	12(63,2%)	8(47,1%)		6(54,5%)	16(53,3%)	
Pleura	3(7,1%)	2(10,5%)	1(5,9%)		0(0%)	3(10%)	
Lymph node metastasis	4(9,5%)	1(5,3%)	1(5,9%)		1(9,1%)	3(10%)	
Brain	3(7,1%)	0(0%)	3(17,6%)		1(9,1%)	2(6,7%)	
Liver	4(9,5%)	2(10,5%)	1(5,9%)		2(18,2%)	2(6,7%)	
Skin	1(2,4%)	1(5,3%)	0(0%)		0(0%)	1(3,3%)	
Adrenal glands	2(4,8%)	0(0%)	2(11,8%)		0(0%)	2(6,7%)	
Bone	1(2,4%)	0(0%)	1(5,9%)		1(9,1%)	0(0%)	
Muscle	1(2,4%)	1(5,3%)	0(0%)		0(0%)	1(3,3%)	

Supplementary table 2 : First EGFR TKI therapy and MET alterations of patients with an EGFR exon 19

deletion or an EGFR exon 21 mutation on the initial biopsy. *: % calculated with the number of patients with a

MET FISH ; **: % calculated with the number of patients with a MET IHC ; TKI : tyrosine kinase inhibitor ; IHC :

Immunocytochemistry ; FISH : Fluorescence In Situ Hybridization ; p : p value

	Patients with EGFR exon 19 deletion	Patients with EGFR exon 21 L858R mutation	p
	N = 23	N =16	
First EGFR TKI			1
gefintib or erlotinib	22 (95,7%)	16 (100%)	
afatinib	1 (4,3%)	0 (0%)	
MET FISH on re-biopsy	21 (91,3%)	12 (75%)	0,21
MET amplified on re-biopsy	12 (57,1%)*	6 (50%)*	0,73
MET IHC on re-biopsy	20 (87%)	13 (81,25%)	0,67
MET IHC 3+ on re-biopsy	20 (100%)**	13 (100%)**	1

Supplementary table 3 : Molecular alterations and prognosis of T790M positive patients. * *lost of follow*

up immediately after EGFR TKI progression. * *patient 45 : the T790M mutation was not detected on the re-biopsy displaying*

MET amplification. However, very few tumor cells were found in this sample. The T790M mutation was detected in a tumor

biopsy obtained before the re-biopsy displaying MET amplification in this patient. † *patient 46 : the research of T790M*

mutation was not performed on the re-biopsy displaying MET amplification. The T790M mutation was detected in

circulating free DNA in this patient. OS : overall survival. PPOS : post progression overall survival. OS and PPOS are expressed

in months.

ID	MET amplification	Primary EGFR mutation	OS	PPOS
5	+	Exon 19 deletion	121,3	8,7
16	-	Exon 21 L858R mutation	26,7	16,0
18	+	Exon 21 L858R mutation	43,1	36,9
22		Exon 19 deletion	36,6	14,6
26	-	Exon 19 deletion	36,2	23,8
27		Exon 21 L858R mutation	25,0	17,0
28	+	Exon 21 L858R mutation	21,8	1,6
34*	-	Exon 19 deletion	37,1	0
35		Exon 19 deletion	27,7	13,7
45**	+	Exon 19 deletion	33,8	18,6
46†	+	Exon 19 deletion	44,3	12,9

Article 2 (soumis, JNCI) : Resistance through *MET* amplification in EGFR mutated NSCLC promotes epithelial to mesenchymal transition and metastasis

S Baldacci^{1,2,3*}, Z Kherrouche^{3,4*}, V Cockenpot^{2,3,5}, L Stoven^{1,2,3}, MC Copin^{2,3,5}, E Werkmeister⁶, N Marchand³, M Kyheng⁷, D Tulasne³, A.B. Cortot^{1,2,3}

(1) Thoracic Oncology Department, CHU Lille, Siric OncoLille, F-59000, Lille, France; (2) Univ Lille, Lille, France ; (3) Univ. Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161 - M3T - Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, F-59000 Lille, France ; (4) Institut Pasteur de Lille ; (5) Pathology department CHRU Lille ; (6) Biolmaging Center Lille Nord de France ; (7) EA 2694 Université de Lille

** These authors contributed equally to this work.*

Corresponding Authors : Pr Alexis Cortot, alexis.cortot@chru-lille.fr

Dans les CBNPC EGFR muté l'amplification de *MET* lors de la résistance à l'ITK EGFR induit un phénotype métastatique et une transition épithélio-mésenchymateuse.

Contexte : Le traitement des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) EGFR mutés repose sur les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) du récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGFR). Cependant tous les patients traités par ITK EGFR finissent par présenter une progression tumorale, du fait de mécanismes de résistance comme l'amplification du gène codant pour le récepteur tyrosine kinase MET. Il n'existe actuellement aucune donnée sur les modifications phénotypiques induites par l'activation de MET dans ce contexte. L'objectif de cette étude est de déterminer si l'amplification de *MET*, lors de la résistance aux ITK EGFR dans les CBNPC EGFR mutés, confère aux cellules tumorales un phénotype plus agressif.

Méthodes : Les capacités de prolifération, de croissance sans ancrage, de formation de sphéroïdes, de résistance à l'anoïkis et de migration ont été étudiées *in vitro* dans la lignée HCC827, dérivée d'un CBNPC EGFR muté, et dans sa lignée fille HCC827-GR6 (GR6) devenue résistante aux ITK EGFR *via* une amplification du gène *MET*. L'expression de la vimentine, de ZEB1, et de la E-cadherine a également été étudiée dans les deux lignées cellulaires afin d'évaluer l'impact de l'amplification de MET sur la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). *In vivo* la croissance tumorale et le potentiel métastatique ont respectivement été analysés dans des modèles murins de xénotgreffe ectopique et d'injection intracardiaque. Enfin la durée jusqu'à apparition de nouvelles métastases, après la progression sous ITK EGFR, a été évaluée dans une cohorte rétrospective multicentrique de patients avec un CBNPC EGFR muté métastatique, présentant une forte surexpression de MET en immunohistochimie (score 3+) ou une amplification de *MET* en FISH sur une re-biopsie réalisée après la progression sous ITK EGFR.

Résultats : *In vitro*, l'amplification de *MET* induisait une augmentation significative de la prolifération, de la croissance sans ancrage, de la formation de sphéroïdes, de la résistance à l'anoïkis et de la migration. En présence d'un inhibiteur de MET, le PHA-665752, ces différentes propriétés biologiques étaient réduites de façon significative dans les cellules GR6 porteuses de l'amplification de *MET*. Il était également mis en évidence dans les cellules GR6 une augmentation de l'expression de la vimentine et de ZEB1. *In vivo*, l'amplification de *MET* augmentait significativement la croissance tumorale et le potentiel métastatique. Un traitement par crizotinib, ITK ciblant MET, diminuait de façon significative le potentiel métastatique des cellules porteuses de l'amplification de *MET*. Enfin les patients atteints d'un CBNPC EGFR muté, porteur d'une amplification de *MET* à la résistance à l'ITK EGFR, présentaient une durée jusqu'à apparition de nouvelles métastases plus courte après progression sous ITK EGFR que les patients avec une forte surexpression de MET sans amplification génique.

Conclusion

L'amplification de *MET* dans un contexte de résistance aux ITK EGFR est associée à un phénotype tumoral plus agressif. Ces résultats plaident en faveur d'une utilisation précoce d'inhibiteurs de MET en association avec les ITK EGFR afin d'éviter l'émergence d'un clone tumoral résistant plus agressif.

Abstract

Background: Five to 20% of metastatic EGFR mutated non-small cell lung cancers (NSCLC) displayed EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors (TKI) acquired resistance through *MET* amplification. The effects of the *MET* amplification on the tumor cell phenotype in this context remain unknown. This study aimed to determine whether acquisition of *MET* amplification in EGFR mutated NSCLC affects biological properties of cancer cells beyond resistance to EGFR TKIs.

Methods: biological properties of the HCC827 cell line, derived from an EGFR mutated NSCLC, were compared *in vitro* and *in vivo* to its daughter cell line HCC827-GR6 which became resistant to EGFR TKI through *MET* amplification. The effect of MET TKI in these models was also analysed. We evaluated the time to new metastasis after EGFR TKI progression in EGFR mutated NSCLC, exhibiting *MET* amplification or high MET overexpression on a re-biopsy performed after TKI EGFR progression.

Results: *In vitro*, the *MET* amplification significantly enhanced proliferation, anchorage independent growth, spheroid formation, anoikis resistance, migration, and the expression of Vimentin and ZEB1. Treatment with a MET TKI, the PHA-665752, significantly reduced these characteristics. *In vivo*, the *MET* amplification significantly increased the tumor growth and the metastatic potential. Finally, patients with an *MET* amplification displayed a time to new metastases after EGFR TKI progression significantly shorter than patients with only high MET overexpression without MET amplification.

Conclusion: Resistance through *MET* amplification in EGFR mutated NSCLC promotes an aggressive phenotype characterized by an increase of the metastatic spread and by an epithelial to mesenchymal transition.

Introduction

EGFR mutated NSCLC accounts for 10 to 40% of all NSCLC, depending on the geographic area¹. At a metastatic stage, the treatment of these cancers relies on EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs)^{2,3}. Despite the initial efficacy of TKIs, all patients eventually develop tumor progression due to various mechanisms of resistance⁴. The most frequent is the emergence of a T790M mutation which is a second EGFR mutation. In 5 to 22% of the cases, the resistance is due to the amplification of a gene coding for the MET tyrosine kinase receptor⁵⁻¹⁰. This amplification leads to overexpression and constitutive activation of the MET receptor. Thereby MET maintains activation of proliferative signals in the cell, such as the PI3K or the MAPK pathways despite EGFR TKI⁵. Whether the type of mechanisms of resistance impacts tumor behavior is still poorly known. It has been shown that the T790M mutation induces a less aggressive tumor phenotype during EGFR TKI resistance. Indeed it decreases cell proliferation and patients that present this resistance mechanism have a better prognosis than the others^{11,12}. Regarding the *MET* amplification, the effects on the tumor cell phenotype and prognosis of patients remain unknown. In the present study, we aimed to determine whether acquisition of *MET* amplification in EGFR mutated NSCLC affects biological properties of cancer cells beyond resistance to EGFR TKIs and induces an aggressive tumor phenotype.

Results

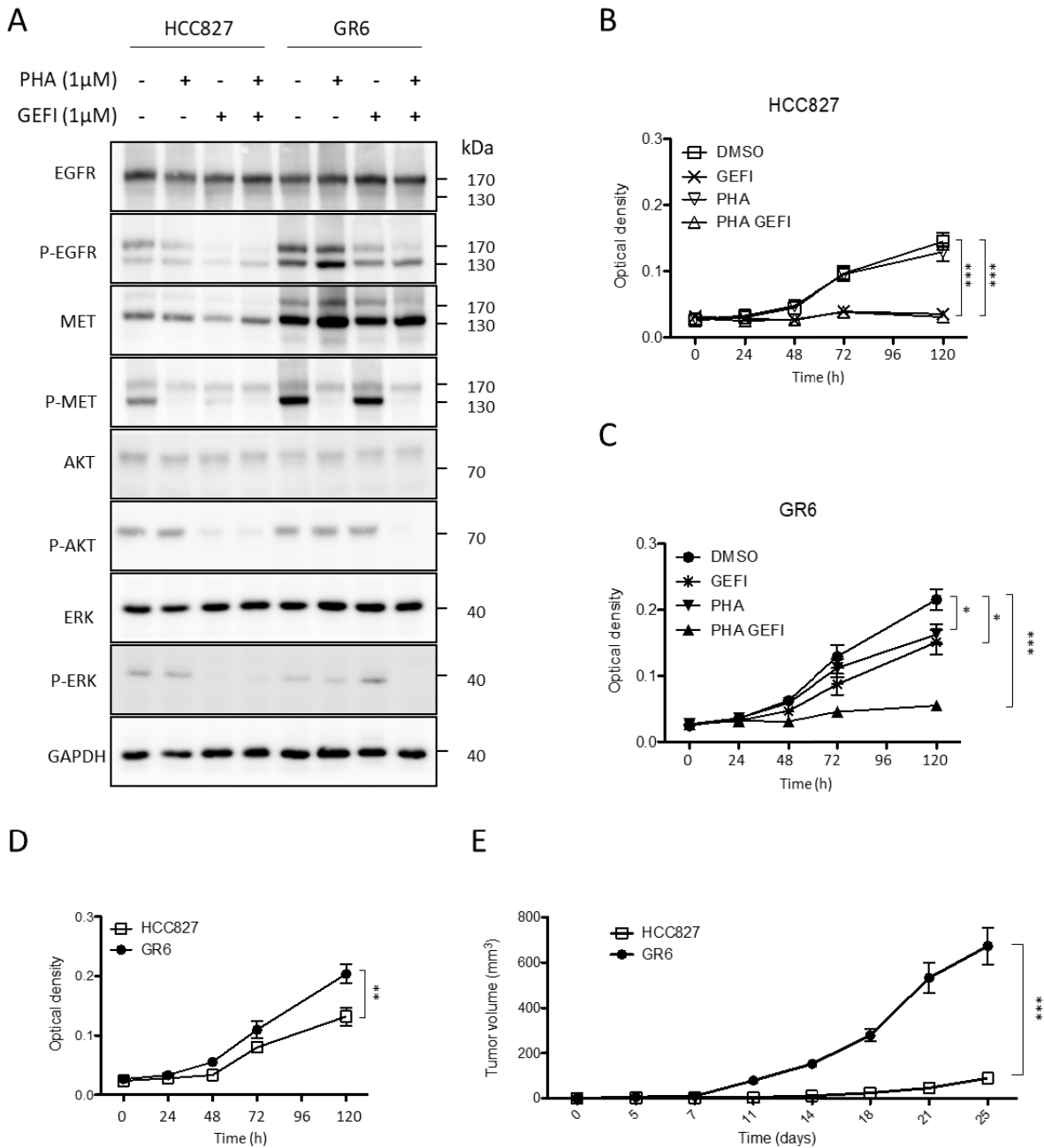
***MET* amplification enhances proliferation and tumor growth in EGFR mutated non small cell lung cancer**

The impact of *MET* amplification was investigated *in vitro* in the HCC827 cell line which harbors an activating EGFR mutation, and in its derived cell line HCC827GR6, later called GR6, which has acquired resistance to EGFR TKI through a *MET* amplification⁵. As previously published, treatment with the EGFR TKI gefitinib was sufficient to inhibit the phosphorylation of AKT and ERK in the HCC827 cell line (Figure 1A). Conversely, the activation of the PI3K and MAPK pathways persisted in the GR6 cells despite the presence of gefitinib. A cotreatment with the MET TKI PHA665752 (PHA) and gefitinib was required to

inhibit activation of these pathways in GR6 cells. As expected, gefitinib completely inhibited HCC827 cell proliferation whereas PHA had no impact (Figure 1B). By contrast, in GR6 cells inhibition of EGFR did not stop the GR6 growth and PHA alone partly reduced proliferation (Figure 1C). Combination of gefitinib and PHA was necessary to stop proliferation of GR6 cells. We then compared directly the proliferation of HCC827 and GR6 cells and we observed a higher proliferation of GR6 cells (Figure 1D). These results suggest that *MET* amplification is not only a way to maintain proliferation under EGFR inhibition, but it also enhances proliferation of GR6 cells whereas MET activity is not involved in the proliferation of HCC827 cells.

In order to determine whether enhanced proliferation of GR6 cells translated into increased tumor growth, HCC827 and GR6 cells were subcutaneously injected in immunocompromised SCID mice and tumor volume was monitored every 2 to 3 days during one month. Mice injected with GR6 cells showed significantly faster tumor growth and increased median tumor volume (7.6 fold increase by day 25), compared with mice injected with HCC827 cells (Figure 1E).

Figure 1 : MET amplification enhances proliferation and tumor growth of EGFR mutated non small cell lung cancer cells. A) HCC827 and GR6 cells were treated for 24h with DMSO, or with a MET tyrosine kinase inhibitor (TKI), the PH665752 (PHA ; 1 μ M) alone, or with an EGFR TKI, the gefitinib (GEFI ; 1 μ M) alone, or in combination. Western blot analysis with the indicated antibodies was performed on cell lysates of each condition. GAPDH was used as a loading control. Results are representative of three experiments. **B) and C)** Proliferation of HCC827 and GR6 cells treated with DMSO, or with PHA665752 (PHA ; 1 μ M), or gefitinib (GEFI ; 1 μ M), or in combination (PHA GEFI ; 1 μ M) was measured at the indicated time point by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assays. Results are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Statistical significance was calculated by two-tailed Mann-Whitney test (* P < .05, *** P < .001). **D)** Proliferation of HCC827 and GR6 cells were assessed at the indicated time point by MTT assays without any treatment. Statistical significance was calculated by two-tailed Mann-Whitney test (** P < .01). **E)** SCID mice were subcutaneously injected with HCC827 or GR6 cells (n=10 mice per group). Tumor size was measured at the indicated time point. Data are mean \pm SEM. Statistical significance was calculated by two-way analysis of variance (ANOVA) (*** P <.001).



MET amplification induces an aggressive phenotype in EGFR mutated NSCLC cells

Subsequently, we aimed to determine whether MET amplification confers other properties than resistance to EGFR TKIs and higher proliferation. When cultured in suspension in non-adherent tubes, GR6 cells showed a dramatically enhanced ability to grow unanchored as spheroid compared to parental cells (Figure 2A). Exposure of HCC827 cells to gefitinib significantly reduced the spheroid formation, whereas PHA had no effect (Figure 2B). By contrast, we observed a significant decrease in GR6 cells spheroid formation after treatment with PHA or gefitinib alone. The spheroid formation was almost abolished when the two drugs were combined.

The effect of the *MET* amplification on the anchorage independent growth was also assessed by soft agar colony assays. In absence of treatment, the number of clones obtained with the GR6 cells was almost 2 fold higher compared to the HCC827 cells (Figure 2C). In HCC827 cells, gefitinib significantly reduced colony formation of HCC827 whereas PHA had no effect (Figure 2D). On the contrary, gefitinib and PHA alone significantly reduced the number of clones obtained with the GR6 cells and a greater decrease of anchorage independent growth abilities was observed with both drugs given together. Moreover we observed a significant decrease in GR6 cells by silencing MET with a siRNA (supplementary figure 1)

Migration was studied by time lapse microscopy to allow quantitative analysis regardless of any potential effect of cell proliferation and/or survival. Cell tracking revealed a migration velocity of GR6 cells higher than HCC827 cells with a median speed of 37.7 μm and 14.5 μm per hour respectively (Figure 2E). While inhibition of EGFR activity is sufficient to reduce the migration ability of HCC827 cells, it did not significantly impact the *MET* amplified cell line velocity. By contrast, PHA treatment of GR6 cells significantly reduced their migration capacities, demonstrating the involvement of MET in this gain of mobility further inhibited by co-treatment.

In order to evaluate the impact of *MET* amplification on anoikis, a programmed cell death induced by the loss of attachment to the appropriate matrix, HCC827 and GR6 cells were cultured in non-adherent tubes before annexin V staining. After 5 days in suspension, the proportion of apoptotic cells was significantly lower with GR6 than HCC827 cells (11.2 % versus 34.5 %) (Figure 2F). Proportion of HCC827 dead cells was not affected by PHA but

increased to 66.5% following gefitinib. Inversely, proportion of GR6 dead cells was not significantly affected by gefitinib but increased significantly to 22.8% following PHA treatment. Combined inhibition of EGFR and MET receptors raised the level of GR6 dead cells to 74.1%.

All together these results show that *MET* amplification provides new capacities to EGFR-mutated cells through an increase of spheroid formation, anchorage independent growth, cell migration and anoikis resistance. Interestingly, in the *MET* amplified cell line these biological responses are dependent on the MET activity but remain also partly dependent on EGFR activity.

Figure 2 : MET amplification increases spheroid formation, anchorage independent growth, cell migration and inhibits anoikis in EGFR mutated non small cell lung cancer cells.

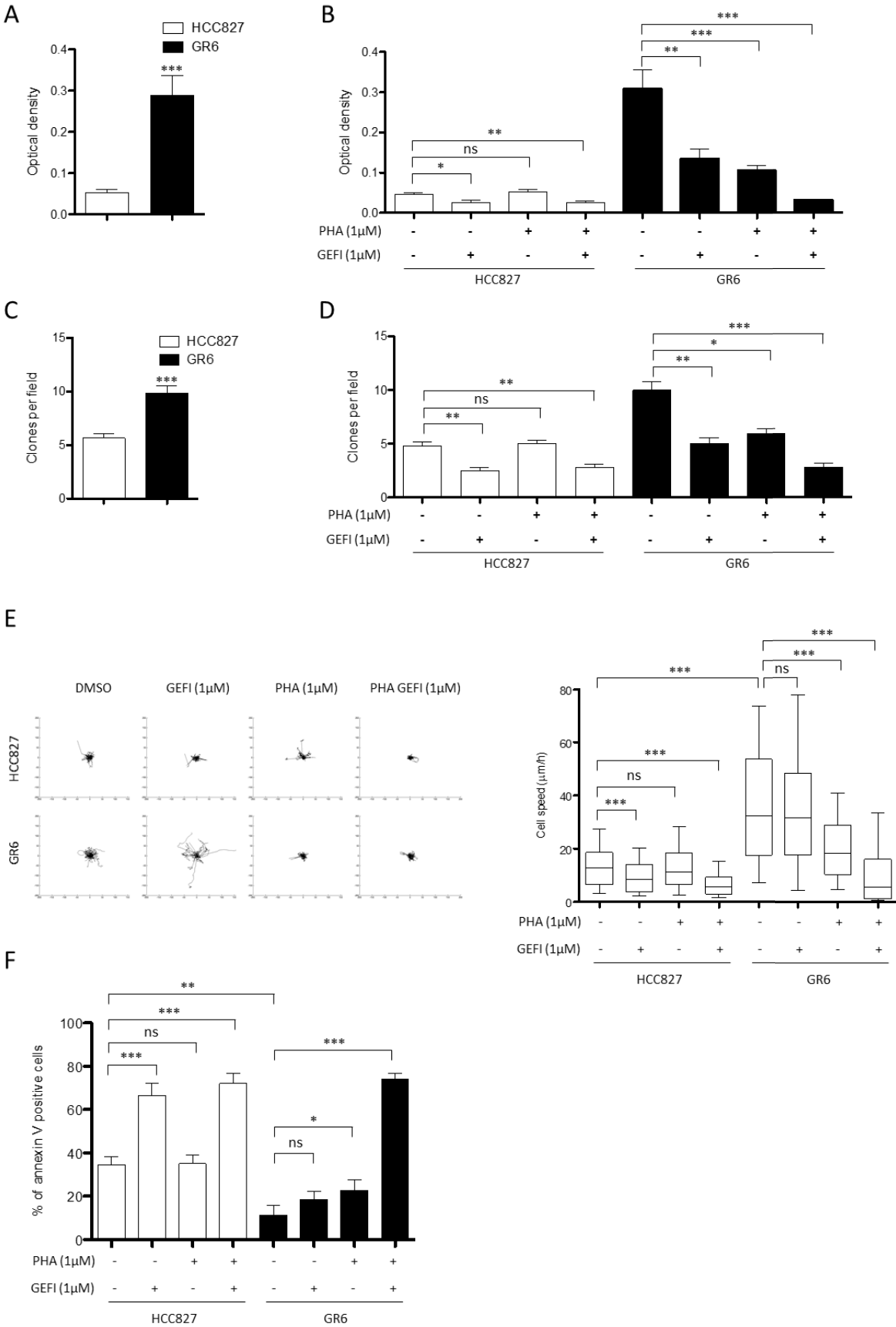


Figure 2 : *MET* amplification increases spheroid formation, anchorage independent growth, cell migration and inhibits anoikis in EGFR mutated non small cell lung cancer cells. A) Spheroid formation of HCC827 and GR6 cells was evaluated by MTT assays after 7 days of culture in non adherent tubes. Results are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Statistical significance was calculated by t-test ($***P < .001$). **B)** The effect of PHA665752 (PHA ; 1 μ M) and/or gefitinib (GEFI ; 1 μ M) on spheroid formation was evaluated in both cell lines. Results are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Statistical significance was calculated by t-test ($*P < .05$, $**P < .01$, $***P < .001$, ns non significative). **C)** Anchorage independent growth of HCC827 and GR6 cells was measured by counting clone formation in soft agar after 14 days of culture. Statistical significance was calculated by two-tailed Mann-Whitney ($***P < .001$). **D)** The effect of PHA665752 (PHA ; 1 μ M) and/or gefitinib (GEFI ; 1 μ M) on anchorage independent growth was evaluated in both cell lines. Results are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Statistical significance was calculated by two-tailed Mann-Whitney ($*P < .05$, $**P < .01$, $***P < .001$, ns non significative). **E)** Migration speed of isolated HCC827 and GR6 cells, with or without treatment with PHA665752 (PHA ; 1 μ M) and/or gefitinib (GEFI ; 1 μ M) was assessed by time lapse microscopy. Tracks of 50 randomly selected cells per condition were represented and placed on the same origin (1 pixel = 0.645 μ m). The pooled results of three independent experiments are presented as box plot of three independent experiments. Statistical significance was calculated by two-tailed Mann-Whitney test ($***P < .001$). **F)** Proportion of apoptotic cells in HCC827 and GR6 cell lines, with or without treatment with PHA665752 (PHA ; 1 μ M) and/or gefitinib (GEFI ; 1 μ M), was assessed by flow cytometry after 4 days of culture in non adherent tubes and after labelling with annexin V-APC. Results are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Statistical significance was calculated by two-tailed Mann-Whitney test ($*P < .05$, $**P < .01$, $***P < .001$, ns non significative).

MET* amplification promotes metastasis formation *in vivo

Because we found that *MET* amplification increases tumor migration, resistance to anoikis and anchorage-independent growth, we hypothesized that it could favor formation of metastasis. We established and characterized HCC827 and GR6 cell lines stably transfected with a luciferase-expressing vector. The levels of bioluminescence produced in presence of luciferin by these cells, named HCC827-luc and GR6-luc, were similar (supplementary Figure 2). The metastatic potential of both cell lines was investigated in SCID mice by measuring bioluminescence 35 days after intracardiac injection in the left ventricle, a model of cell dissemination via the bloodstream allowing for the monitoring of metastasis formation. Mice injected with GR6-luc cells showed a significantly higher overall bioluminescence than those injected with HCC827-luc cells, suggesting an increase of the metastatic burden induced by the *MET* amplification (Figure 3A and 3B, images of all mice are available in supplementary Figures S3A and S3B). This result was further confirmed by the histological analysis of 5 organs systematically collected after the mice sacrifice. Indeed, in mice injected with the HCC827-luc cells, a mean of 0.7 organ with at least one metastasis per mice was observed versus 1.8 in mice injected with the GR6-luc cells (Figure 3C). Moreover, the number of metastases found inside each collected organ was higher in mice injected with GR6-luc cells compared to those injected with the HCC827-luc cells (Figure 3D). Furthermore, because the lung is a classical site of metastasis for NSCLC cells, lung metastasis formation was analyzed also in a model of SCID mice injected in the right ventricle, rather than the left ventricle. By histological analysis, we observed a mean of 3.7 metastases per lung of HCC827-luc injected mice and 7.2 metastases per lung of GR6-luc injected mice (supplementary Figure S4A).

In order to confirm the role of the *MET* pathway in the metastatic advantage observed in *MET*-amplified cells, SCID mice injected with GR6-luc cells in the left ventricle were treated either with a *MET* TKI, crizotinib, or vehicle. We found that crizotinib significantly decreased the overall bioluminescence of the mice as well as the number of metastatic organs detected by histological analysis *ex vivo* (Figure 3E, 3F and 3G, images of all mice are available in supplementary Figures S3C and S3D). The number of metastases identified by histological analysis inside each collected organ was also reduced by crizotinib (Figure 3H). In a similar manner, crizotinib treatment reduced the number of lung

metastases in mice injected in the right ventricle with GR6-luc cells (supplementary Figure S4B).

Taken together, these results demonstrate that *MET* amplification favors formation of metastases in EGFR mutated NCSLC tumors. Inhibition of MET activity is sufficient to reduce the metastatic advantage conferred by *MET* amplification.

Figure 3 : MET amplification favors metastasis development of EGFR mutated non small cell lung cancer cells.

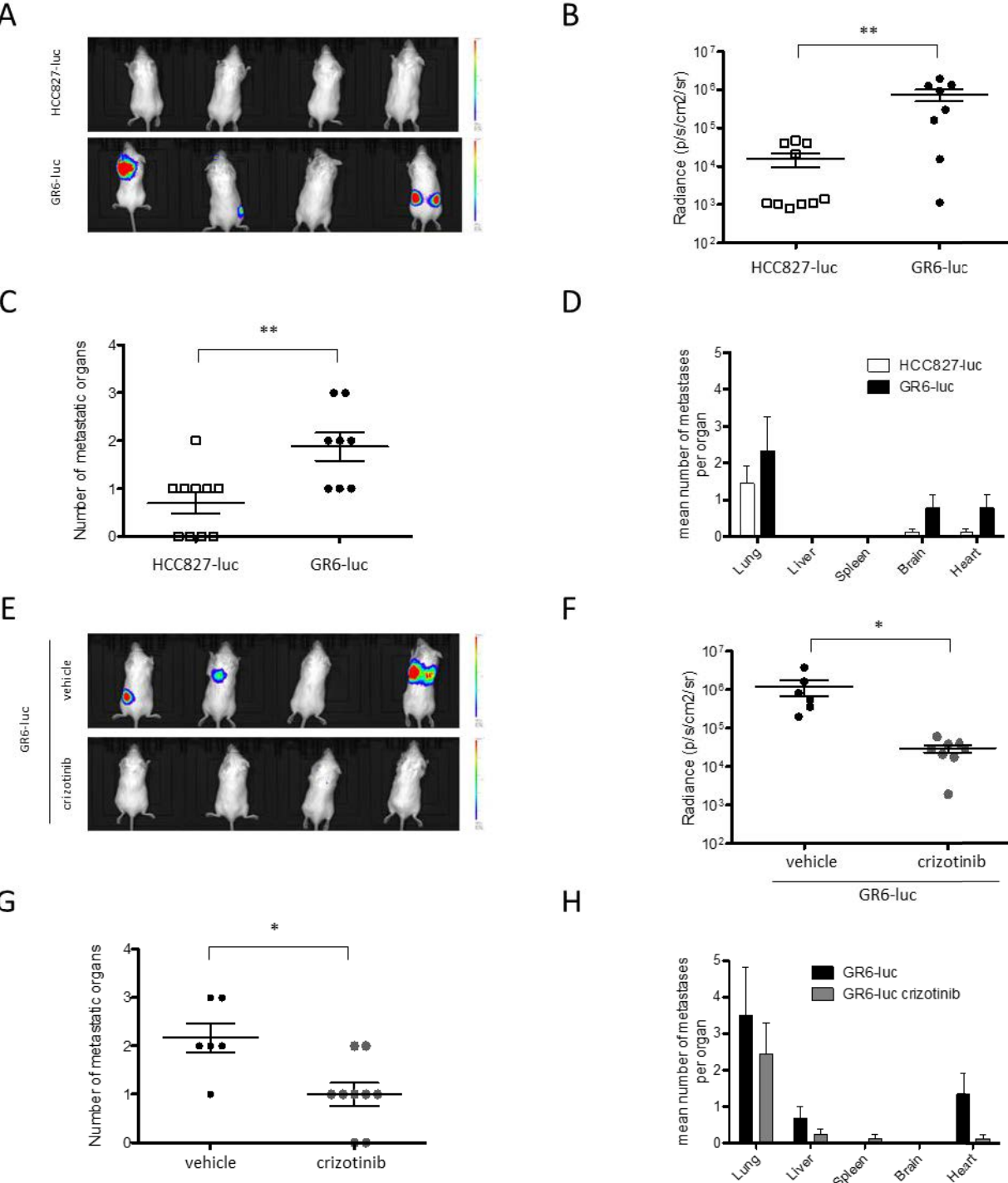


Figure 3 : *MET* amplification favors metastasis development of EGFR mutated non small cell lung cancer cells. **A)** Representative bioluminescence imaging of SCID mice 35 days after injection in the left ventricle with HCC827-luc or GR6-luc cells (images of all mice are available in supplementary Figures S2A and S2B). **B)** The metastatic potential was assessed by measuring average radiance at luminescent peak of SCID mice 35 days after injection in the left ventricle with HCC827-luc or GR6-luc cells. Results are presented as mean \pm SEM and each data point represents average radiance of one mouse. Statistical significance was calculated by two-tailed Mann-Whitney test (** $P < .01$). **C)** Number of metastatic organs with a least one metastasis identified by histological analysis among 5 organs (lungs, liver, spleen, brain, and heart) systematically collected at the sacrifice of SCID mice 37 days after the injection in the left ventricle with HCC827-luc or GR6-luc. Results are presented as mean \pm SEM and each data point represents the number of metastatic organs of one mouse. Statistical significance was calculated by two-tailed Mann-Whitney test (** $P < .01$). **D)** Mean number of metastases identified by histological analysis inside each collected organs at the sacrifice of SCID mice 37 days after the injection in the left ventricle with HCC827-luc or GR6-luc. Results are presented as mean \pm SEM. **E)** Representative bioluminescence imaging of SCID mice, orally treated with crizotinib (50mg/kg daily) or with a vehicle, 35 days after injection in the left ventricle with GR6-luc cells (images of all mice are available in supplementary Figures S2C and S2D). **F)** The metastatic potential was assessed by measuring average radiance at luminescent peak of SCID mice, orally treated with crizotinib or with a vehicle, 35 days later after injection in the left ventricle GR6-luc cells. Results are presented as mean \pm SEM and each data point represents average radiance of one mouse. Statistical significance was calculated by two-tailed Mann-Whitney test (* $P < .05$). **G)** Number of metastatic organs identified by histological analysis among the 5 organs systematically collected at the sacrifice of SCID mice, 37 days after injection in the left ventricle with GR6-luc and initiation of a daily treatment with crizotinib or a vehicle. Results are presented as mean \pm SEM and each data point represents the number of metastatic organs for one mouse. Statistical significance was calculated by two-tailed Mann-Whitney test (* $P < .05$). **H)** Mean number of metastases identified by histological analysis inside each collected organs at the sacrifice of SCID mice 37 days after injection in the left ventricle with GR6-luc and initiation of a daily treatment with crizotinib or a vehicle. Results are presented as mean \pm SEM.

***MET* amplification causes Epithelial to Mesenchymal Transition in EGFR-mutated NSCLC**

Given the involvement of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in formation of metastasis, we hypothesized that *MET* amplification could induce EMT in EGFR mutated NSCLC. We analyzed in the HCC827 and GR6 cell lines the gene expression of an epithelial marker, the E-cadherin, and two mesenchymal markers vimentin and ZEB1 (Figure 4A, 4B, and 4C). The E-cadherin mRNA level was not significantly different between the two cell lines. Yet, we observed a mean mRNA level of 9.2 fold higher for the vimentin, and 3.9 higher for ZEB1 in the GR6 cells compared to the HCC827. PHA significantly reduced expression of vimentin and ZEB1 in GR6 cells whereas it did not modify the mRNA level of these markers in HCC827 cells (Figure 4D and 4E).

To evaluate EMT in a context of tumor progression, immunohistochemistry (IHC) were performed on HCC827 and GR6 xenografted tumors and the stainings were quantified using an H-score analysis. As expected, higher expression of the MET receptor and increased MET phosphorylation were obtained in GR6 compared to HCC827 subcutaneous xenograft tumors in SCID mice (Figure 4F). Expression of the mesenchymal markers, vimentin and ZEB1, were also increased in the GR6 tumors compared to the HCC827 tumors, whereas the epithelial marker E-cadherin was strongly reduced (Figure 4F).

In pulmonary GR6-luc metastases of mice treated with crizotinib we observed a decrease of MET phosphorylation along with a decrease of vimentin expression and ZEB1 nuclear location and an increase of E-cadherin compared to metastases of mice treated with a vehicle (Figure 4G). Taken together, our results evidence that *MET* amplification induces an EMT phenotype which is indeed dependent of MET tyrosine kinase activity.

Figure 4 : *MET* amplification causes Epithelial to Mesenchymal Transition in EGFR mutated non small cell lung cancer cells.

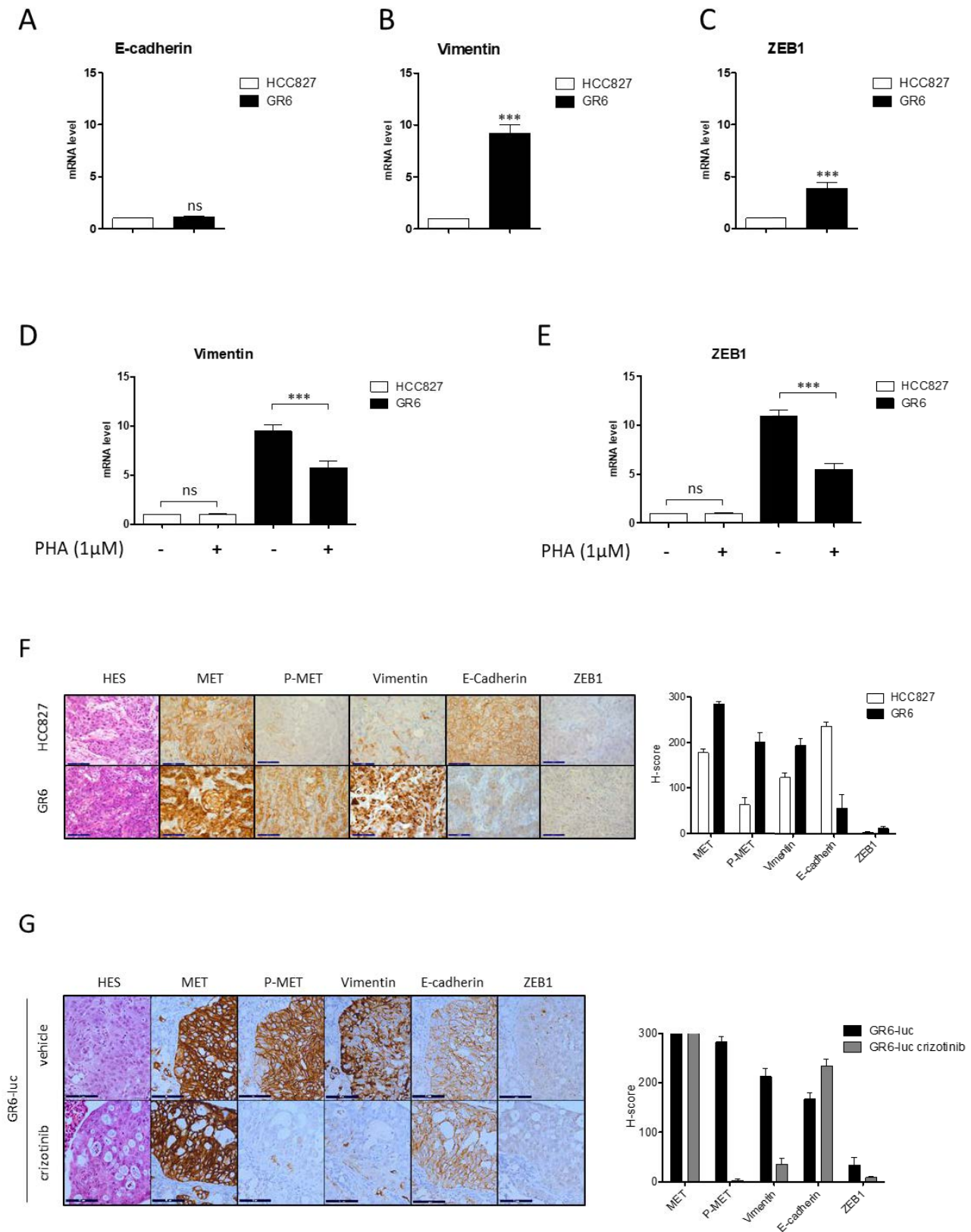


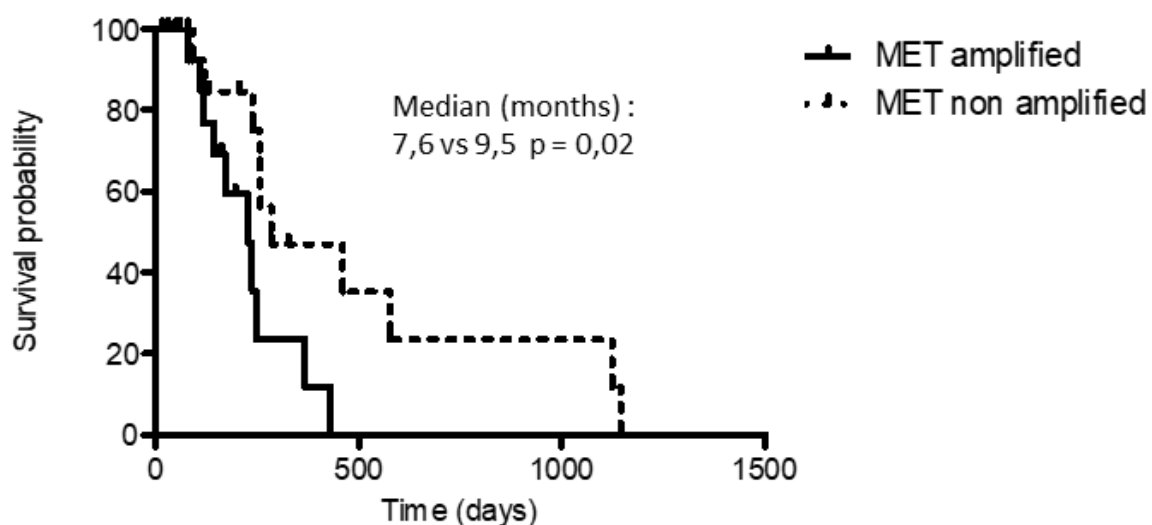
Figure 4 : *MET* amplification causes Epithelial to Mesenchymal Transition in EGFR mutated non small cell lung cancer cells.

A) B) and C) mRNA expression of E-cadherin, Vimentin and ZEB1 were measured by quantitative RT-PCR (RT-qPCR). Results are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Statistical significance was calculated by two-tailed t-test (**P < .01, ***P < .001, ns non significant). **D) and E)** HCC827 and GR6 cells were treated 72h with 1 μ M of PHA-665752. and mRNA expression of E-cadherin, vimentin and ZEB1 were measured by quantitative RT-PCR (RT-qPCR). Results are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Statistical significance was calculated by two-tailed t-test (**P < .01, ***P < .001, ns non significant). **F)** Representative images at 200X magnification and H-scores of MET, phospho-MET (Tyr1234/Tyr1235), E-cadherin, Vimentin, and ZEB1 immuno-histochemistry in HCC827 and GR6 subcutaneous tumors (scale bar = 50 μ m). **G)** Representative images at 200X magnification and H-scores of MET, phospho-MET (Tyr1234/Tyr1235), E-cadherin, Vimentin, and ZEB1 immuno-histochemistry in GR6-luc lung metastases with or without crizotinib treatment (scale bar = 50 μ m).

***MET* amplification promotes metastases in EGFR mutated NSCLC patients following progression on EGFR TKI**

Finally, we addressed the question whether *MET* amplification could promote metastases in patients. For that purpose, we took advantage of the clinical data from a previous study of EGFR mutated NSCLC patients with either *MET* amplification or *MET* high overexpression following progression on EGFR TKI (Article 1). In this nationwide study, the time to new metastasis after EGFR TKI progression was available for 17 patients harboring *MET* amplification and for 14 patients displaying a *MET* overexpression without *MET* amplification. No significant difference was observed between patients with *MET* amplification and those with *MET* overexpression without *MET* amplification regarding clinical characteristics and EGFR TKI treatment. We found that patients harboring *MET* amplification had a significantly shorter time to new metastasis compared to patients with only *MET* overexpression without *MET* amplification (Hazard Ratio = 3.44, CI95% (1.20 – 9.83) ; median 7.6 months vs 9.5 months $p = 0.02$) (Figure 5). This result suggests that *MET* amplification following EGFR TKI progression promotes new metastasis in EGFR mutated NSCLC patients.

Figure 5 : Compared to *MET* overexpression alone, *MET* amplification favors the metastatic progression in EGFR mutated NSCLC after EGFR TKI resistance. The median time to new metastasis after EGFR TKI progression is estimated by Kaplan-Meier curves in a previously published cohort of EGFR mutated NSCLC harboring a *MET* amplification (17 patients) or a *MET* overexpression (14 patients) without *MET* amplification after EGFR TKI progression. Statistical significance was calculated by log-rank test.



Discussion

While the *MET* amplification is a well-characterized EGFR TKI mechanism of resistance in EGFR mutated NSCLC, the consequences of this alteration on the tumor phenotype have not been studied. In this report, we show that *MET* amplification is not only a way to by-pass EGFR signaling during EGFR TKI resistance but it also enhances cell proliferation, anchorage independent growth, anoikis resistance and migration. *In vivo*, *MET* amplification increases tumor growth and metastases formation, and is associated with an EMT phenotype. Finally, we found that patients harboring *MET* amplification as a mechanism of resistance to EGFR TKI display higher risk of developing new metastases.

MET receptor has already been shown to promote invasive growth. In epithelial cells, *MET* activation induces scattering, migration, escape from apoptosis and proliferation¹³. These properties are essential to the development of epithelial organs, placenta, muscles, and neurons during embryogenesis in which *MET* is highly implicated^{14–18}. Dysregulation of the *MET* activity through autocrine secretion of HGF or overexpression of the receptor leads to an increase of motility, invasion, and resistance to anoikis in cancer cells^{19–22}. *In vivo*, Navab *et al.* demonstrated that overexpression of *MET* and HGF in the H460 NSCLC cell line promotes tumor growth and systemic metastasis²³. Yet, the additional impact of *MET* amplification on the phenotype of EGFR mutated NSCLC cells in the particular context of resistance to EGFR TKI had never been addressed so far. Our results show that *MET* amplification induces an aggressive phenotype and metastasis in this particular context. This was not anticipated as in EGFR mutated NSCLC cells, EGFR is already known to stabilize and crossactivate *MET* and this crosstalk facilitates EGF-induced migration and invasion and promotes brain metastases²⁴. Still, we found that *MET* amplification provides supplementary deleterious biological properties to cancer cells.

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) may be responsible for the aggressive phenotype observed in *MET*-amplified EGFR-mutated tumors. EMT is a biological process characterized by the loss of epithelial hallmarks and the acquisition of mesenchymal features. It has been involved in promotion of local invasion and metastasis dissemination²⁵. HGF is known to be involved in EMT through *MET* activation^{26,27}. Furthermore, HGF-induced

EMT enhances tumorigenicity and chemoresistance and is associated with poor prognosis in small cell lung cancer²⁸. Here, we show that *MET* amplification can also induce an EMT phenotype independently of HGF stimulation. EMT has been evidenced on tumor samples of patients with acquired resistance to EGFR TKI in EGFR mutated NSCLC^{8,29,30}. Of note, one patient displaying both *MET* amplification and EMT after progression on EGFR TKI has been reported³¹. Other mechanisms leading to EMT have been proposed including TGF β 1 autocrine secretion and FGFR1 transcriptional up regulation^{32,33}. Importantly, we show that treatment with MET TKI can reverse EMT induced by *MET* amplification, which may have clinical relevance for these patients.

Identifying mechanisms of resistance at progression on EGFR TKI in EGFR mutated NSCLC patients is commonly performed, with the objective of adapting next treatment to the identified mechanism, as for osimertinib in case of T790M mutation. Here, we show that the type of mechanism of resistance is not only important for choosing the following treatment, but it also determinates subsequent tumor behavior. Change of the natural history of EGFR-mutated NSCLC according to the mechanism of resistance has been poorly studied so far. Chmielecki et al. have shown that the T790M is associated with a lower proliferation rate than EGFR mutated cells without T790M mutation¹². Accordingly, patients with a T790M mutation may have a favorable prognosis compared to those with another type of mechanism of resistance, independently of subsequent 3rd generation TKI¹¹. Inversely, we found that *MET* amplification is associated with more aggressive cell and tumor phenotypes, and this translates into a propensity for developing new metastases. This is of tremendous relevance since resistance to EGFR TKI through *MET* amplification may become more common as 3rd generation EGFR TKI, which are able to prevent emergence of T790M clones, will be given as first-line therapy³⁴. Indeed, *MET* amplification has been found in 30% of patients at progression on osimertinib³⁵.

Despite association with poor prognosis, only few clinical data are available on the impact of MET dysregulation on the metastatic spread of NSCLC. Benedettini *et al.* reported an increase of MET expression and *MET* copy number gain in cerebral metastasis compared to primary tumors³⁶ of 17 patients. Another study performed in surgically resected NSCLC patients showed that MET expression and MET gene copy number are more frequent in lymph node metastasis than in primary tumors³⁷. In the present work, we observed a

shorter time to new metastasis after EGFR TKI progression in patients with a metastatic EGFR mutated NSCLC and a *MET* amplification on rebiopsy compared to patients with only high MET overexpression (IHC 3+). This result suggests a specific effect of *MET* amplification on metastasis compared to the MET overexpression alone and might reflect an increase of MET signaling activity in the *MET* amplified tumor.

Taken together, our results suggest that allowing emergence of *MET* amplification expose to the risk of a more aggressive disease characterized by an increase of the metastatic potential of EGFR-mutated NSCLC. This finding raises the question of combining EGFR and MET inhibitors before acquired resistance to EGFR TKI in order to prevent emergence of *MET* amplification and guide the tumor evolution to a less deleterious mechanism of resistance such as the T790M. Indeed combining EGFR and MET inhibitors *in vitro* is effective for preventing *MET* amplification as a mechanism of resistance³⁸. However this strategy might be challenged by the tumoral heterogeneity and by the risk of emergence of other aggressive clones such as EMT independently from MET signaling. Early and non invasive detection of *MET* amplification in circulating tumor DNA could represent an attractive tool for selecting patients who may benefit from the combination. Most clinical trials evaluating combination of MET and EGFR inhibitors are proposed once MET amplification has emerged. Our results suggest that this combination should also be evaluated before emergence of *MET* amplification, as first-line therapy, in order to prevent development of an aggressive tumor phenotype. Our findings also support evaluation of this combination in adjuvant setting for patients with localized EGFR-mutated NSCLC. Given the role of MET activation in acquired resistance of other oncogene-addicted cancers to various targeted therapies, including HER2 breast cancers or BRAF-mutated melanoma, our findings support further evaluation of the role of MET in these cancers, and evaluation of the benefit of MET inhibition³⁹.

Materials and methods

Drugs, and cell cultures

DMSO, PHA-665752 and crizotinib were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri). Gefitinib were obtained from Santa Cruz (Dallas, Texas), and neomycin from Life Technologies (Carlsbad, California). DilC12 fluorescent dye was purchased from BD

Biosciences (Franklin Lakes, New Jersey), luciferin from Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts), and isoflurane from Baxter (Deerfield, Illinois).

The lung adenocarcinoma HCC827 and its *MET* amplified counterpart HCC827-GR6 cell lines were obtained from Professor P.A. Jänne and cultured as previously described⁵.

Immunoblotting and Quantitative real-time RT-PCR

Immunoblotting and Quantitative real-time RT-PCR are detailed in the Supplementary Materials.

Cell proliferation, spheroid growth and Anoikis assay

For proliferation analysis, cells were plated in 96-well plates at 2500 per well and treated in complete medium the following day with the relevant agents. At each time point, proliferation was assessed by MTT assay as explained in the Supplementary Materials.

For spheroids growth, 10000 cells per condition were seeded in non-adherent polystyrene tubes (Falcon) in 2ml of complete medium with the corresponding treatment. Fresh medium with the relevant agent were added every 48h. MTT assays were performed after seven days of culture.

For anoikis assay, 200000 cells per condition were seeded in non-adherent tubes in 4ml of complete medium with the corresponding treatment. Fresh medium with the relevant agent were added 48h later. After 4 days of culture, cells were centrifuged, dissociated by trypsinization, and labelled with APC-conjugated Annexin V (Molecular Probe, Eugene, Oregon). Cells were analysed on a FACS Cantoll (BD biosciences, Franklin Lakes, New Jersey).

Anchorage Independent Growth Assays

Cells (8000/well in 12-well plates) were seeded in a 0.4 % agarose in medium mixture and grown for 14 days. One ml of complete medium with or without treatment was added on the top and changed every 48h. The method used to count the colonies is further described in the Supplementary Materials.

Live cell microscopy

Mobility of isolated cells was measured with time-lapse microscopy by acquiring 1 image every 10 minutes on 10 fields per sample during 6 hours in an incubation unit heated at 37°C with 5% CO₂. Further details are provided in the [Supplementary Materials](#).

Mice

Six to eight-week-old SCID mice were maintained in the animal house facility of the Pasteur Institute of Lille, France (Agreement B59-350009). The project (2016071316421826) received ethical approval by French Committee on Animal Experimentation and the Ministry of Education and Research. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

Subcutaneous xenograft model

A solution of 50µl of growth factor reduced Matrigel Matrix (Corning, Corning, New York) and 50uL of PBS (Life Technologies, Carlsbad, California) with 1 million of cells were injected sub-cutaneously into the flank of SCID mice. Tumor size was assessed twice a week by caliper measurements of tumor length (L) and width (W). The tumor volume (V) was calculated with the formula $V=0.5 \times (L \times W^2)$. Mice were sacrificed after 4 weeks of follow up and subcutaneous tumors were fixed in formalin 4% and embedded in paraffin.

Metastasis Assays and *in vivo* treatment

The creation of the HCC827-luc and GR6-luc cell lines and the method of evaluation of their bioluminescence *in vitro* are available in the [Supplementary Materials](#). Cells suspended in 100ul of PBS were injected into the heart of anesthetized mice. Left or right ventricle injections were controlled 40 minutes after injection by bioluminescence imaging with an IVIS Lumina XR (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts). Average radiance of each mouse at luminescent peak was measured 35 days after intracardiac injection as explained in the [Supplementary Materials](#). Mice were sacrificed 37 days after injection. Lungs, spleen, liver, brain and heart were systematically collected for mice injected in the left ventricle and lungs were collected for mice injected in the right ventricle. Organs were fixed in formalin 4% and embedded in paraffin. For *in vivo* treatment experiment mice were randomized after intracardiac injection either in a group orally treated with crizotinib 50 mg/kg/d or a group that received a vehicle daily.

Histopathology and immunohistochemistry

Formalin fixed and paraffin embedded tissues were sliced at 6 different levels per block. The 5µm thick sections were mounted on glass slides and stained with hematoxylin, erythrosine and saffron (HES) using standard procedures. Evaluation of metastasis count was performed blindly by a senior pathologist. IHC was performed using BenchMark XT (Ventana, Oro Valley, Arizona) automated IHC stainer using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) revelation and hematoxylin counter-staining (Bluing Reagent, Ventana, Oro Valley, Arizona). The method used for immunochemistry was further described in the [Supplementary Materials](#).

Statistical analysis

All results are expressed as mean +/- s.e.m. of at least three independent measurements. According to their distribution quantitative variables were compared with a Student's T-test or Mann Withney test. Two-way ANOVA was performed for tumor growth analysis in subcutaneous xenograft model. All statistical testing was conducted at the 2-tailed α level of 0.05. Data were analyzed with GraphPad Prism software version 7 (GraphPad software, San Diego California). Patients and clinical data analysis was further described in the [Supplementary Materials](#).

References

1. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet Lond Engl*. 2016;387(10026):1415-1426. doi:10.1016/S0140-6736(16)00004-0.
2. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*. 2010;362(25):2380-2388. doi:10.1056/NEJMoa0909530.
3. Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009;361(10):947-957. doi:10.1056/NEJMoa0810699.
4. Cortot AB, Jänne PA. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc*. 2014;23(133):356-366. doi:10.1183/09059180.00004614.

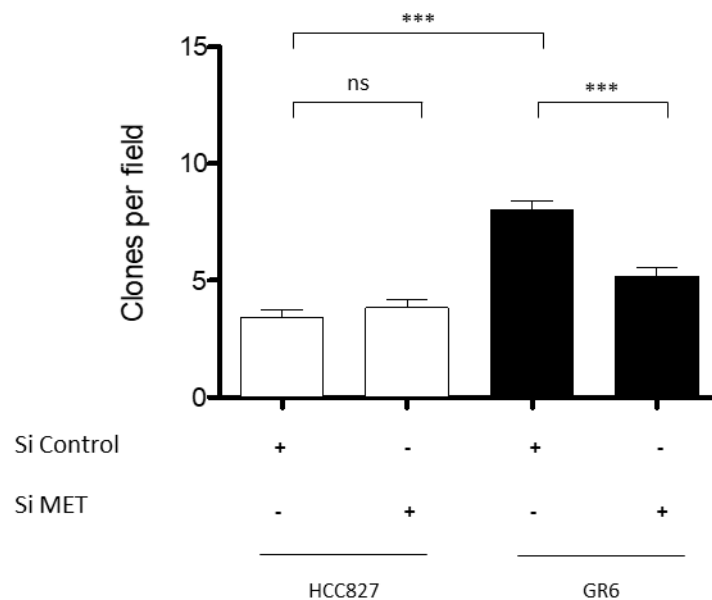
5. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*. 2007;316(5827):1039-1043. doi:10.1126/science.1141478.
6. Bean J, Brennan C, Shih J-Y, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(52):20932-20937. doi:10.1073/pnas.0710370104.
7. Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, et al. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011;17(5):1169-1180. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2277.
8. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med*. 2011;3(75):75ra26. doi:10.1126/scitranslmed.3002003.
9. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2013;19(8):2240-2247. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2246.
10. Noro R, Seike M, Zou F, et al. MET FISH-positive status predicts short progression-free survival and overall survival after gefitinib treatment in lung adenocarcinoma with EGFR mutation. *BMC Cancer*. 2015;15:31. doi:10.1186/s12885-015-1019-1.
11. Oxnard GR, Lo PC, Nishino M, et al. Natural history and molecular characteristics of lung cancers harboring EGFR exon 20 insertions. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2013;8(2):179-184. doi:10.1097/JTO.0b013e3182779d18.
12. Chmielecki J, Foo J, Oxnard GR, et al. Optimization of dosing for EGFR-mutant non-small cell lung cancer with evolutionary cancer modeling. *Sci Transl Med*. 2011;3(90):90ra59. doi:10.1126/scitranslmed.3002356.
13. Gentile A, Trusolino L, Comoglio PM. The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2008;27(1):85-94. doi:10.1007/s10555-007-9107-6.
14. Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*. 1995;376(6543):768-771. doi:10.1038/376768a0.
15. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*. 1995;373(6516):699-702. doi:10.1038/373699a0.
16. Uehara Y, Minowa O, Mori C, et al. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature*. 1995;373(6516):702-705. doi:10.1038/373702a0.
17. Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, Davies AM, Klein R. Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes Dev*. 1997;11(24):3341-3350.

18. Calvi C, Podowski M, Lopez-Mercado A, et al. Hepatocyte growth factor, a determinant of airspace homeostasis in the murine lung. *PLoS Genet.* 2013;9(2):e1003228. doi:10.1371/journal.pgen.1003228.
19. Vадnais J, Nault G, Daher Z, et al. Autocrine activation of the hepatocyte growth factor receptor/met tyrosine kinase induces tumor cell motility by regulating pseudopodial protrusion. *J Biol Chem.* 2002;277(50):48342-48350. doi:10.1074/jbc.M209481200.
20. Park M, Park H, Kim W-H, Cho H, Lee J-H. Presence of autocrine hepatocyte growth factor-Met signaling and its role in proliferation and migration of SNU-484 gastric cancer cell line. *Exp Mol Med.* 2005;37(3):213-219. doi:10.1038/emm.2005.29.
21. Laser-Azogui A, Diamant-Levi T, Israeli S, Roytman Y, Tsarfaty I. Met-induced membrane blebbing leads to amoeboid cell motility and invasion. *Oncogene.* 2014;33(14):1788-1798. doi:10.1038/onc.2013.138.
22. Zeng Q, Chen S, You Z, et al. Hepatocyte growth factor inhibits anoikis in head and neck squamous cell carcinoma cells by activation of ERK and Akt signaling independent of NFkappa B. *J Biol Chem.* 2002;277(28):25203-25208. doi:10.1074/jbc.M201598200.
23. Navab R, Liu J, Seiden-Long I, et al. Co-overexpression of Met and hepatocyte growth factor promotes systemic metastasis in NCI-H460 non-small cell lung carcinoma cells. *Neoplasia N Y N.* 2009;11(12):1292-1300.
24. Breindel JL, Haskins JW, Cowell EP, Zhao M, Nguyen DX, Stern DF. EGF receptor activates MET through MAPK to enhance non-small cell lung carcinoma invasion and brain metastasis. *Cancer Res.* 2013;73(16):5053-5065. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3775.
25. De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(2):97-110. doi:10.1038/nrc3447.
26. Ogunwobi OO, Liu C. Hepatocyte growth factor upregulation promotes carcinogenesis and epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via Akt and COX-2 pathways. *Clin Exp Metastasis.* 2011;28(8):721-731. doi:10.1007/s10585-011-9404-x.
27. Grotegut S, von Schweinitz D, Christofori G, Lehembre F. Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *EMBO J.* 2006;25(15):3534-3545. doi:10.1038/sj.emboj.7601213.
28. Canadas I, Rojo F, Taus A, et al. Targeting epithelial to mesenchymal transition with Met inhibitors reverts chemoresistance in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* November 2013. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1330.
29. Chung J-H, Rho JK, Xu X, et al. Clinical and molecular evidences of epithelial to mesenchymal transition in acquired resistance to EGFR-TKIs. *Lung Cancer Amst Neth.* 2011;73(2):176-182. doi:10.1016/j.lungcan.2010.11.011.
30. Uramoto H, Iwata T, Onitsuka T, Shimokawa H, Hanagiri T, Oyama T. Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 2010;30(7):2513-2517.

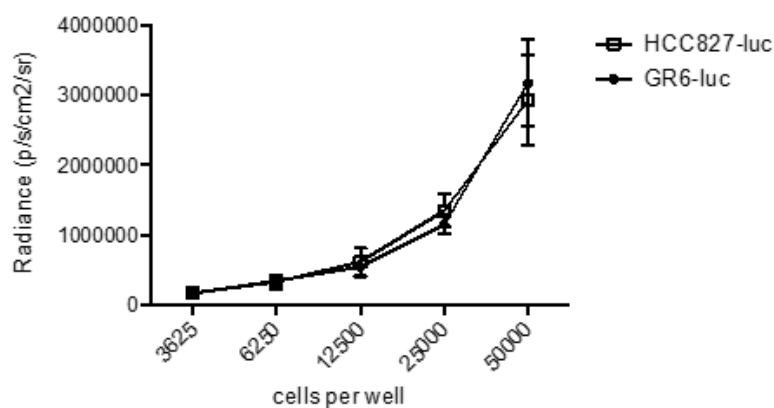
31. Miyoshi S, Kato T, Katayama H, et al. A case of EGFR mutant lung adenocarcinoma that acquired resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors with MET amplification and epithelial-to-mesenchymal transition. *OncoTargets Ther.* 2015;8:783-787. doi:10.2147/OTT.S78911.
32. Soucheray M, Capelletti M, Pulido I, et al. Intratumoral Heterogeneity in EGFR-Mutant NSCLC Results in Divergent Resistance Mechanisms in Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibition. *Cancer Res.* 2015;75(20):4372-4383. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0377.
33. Jakobsen KR, Demuth C, Madsen AT, et al. MET amplification and epithelial-to-mesenchymal transition exist as parallel resistance mechanisms in erlotinib-resistant, EGFR-mutated, NSCLC HCC827 cells. *Oncogenesis.* 2017;6(4):e307. doi:10.1038/oncsis.2017.17.
34. Ramalingam SS, Yang JC-H, Lee CK, et al. Osimertinib As First-Line Treatment of EGFR Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* August 2017;JCO2017747576. doi:10.1200/JCO.2017.74.7576.
35. Piotrowska Z, Thress KS, Mooradian M, et al. MET amplification (amp) as a resistance mechanism to osimertinib. *J Clin Oncol.* 2017;35(15_suppl):9020-9020. doi:10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.9020.
36. Benedettini E, Sholl LM, Peyton M, et al. Met activation in non-small cell lung cancer is associated with de novo resistance to EGFR inhibitors and the development of brain metastasis. *Am J Pathol.* 2010;177(1):415-423. doi:10.2353/ajpath.2010.090863.
37. Tran TN, Selinger CI, Kohonen-Corish MRJ, et al. Alterations of MET Gene Copy Number and Protein Expression in Primary Non-Small-Cell Lung Cancer and Corresponding Nodal Metastases. *Clin Lung Cancer.* 2016;17(1):30-38.e1. doi:10.1016/j.clcc.2015.08.002.
38. Suda K, Murakami I, Katayama T, et al. Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2010;16(22):5489-5498. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1371.
39. Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature.* 2012;487(7408):505-509. doi:10.1038/nature11249.

Supplementary Figures

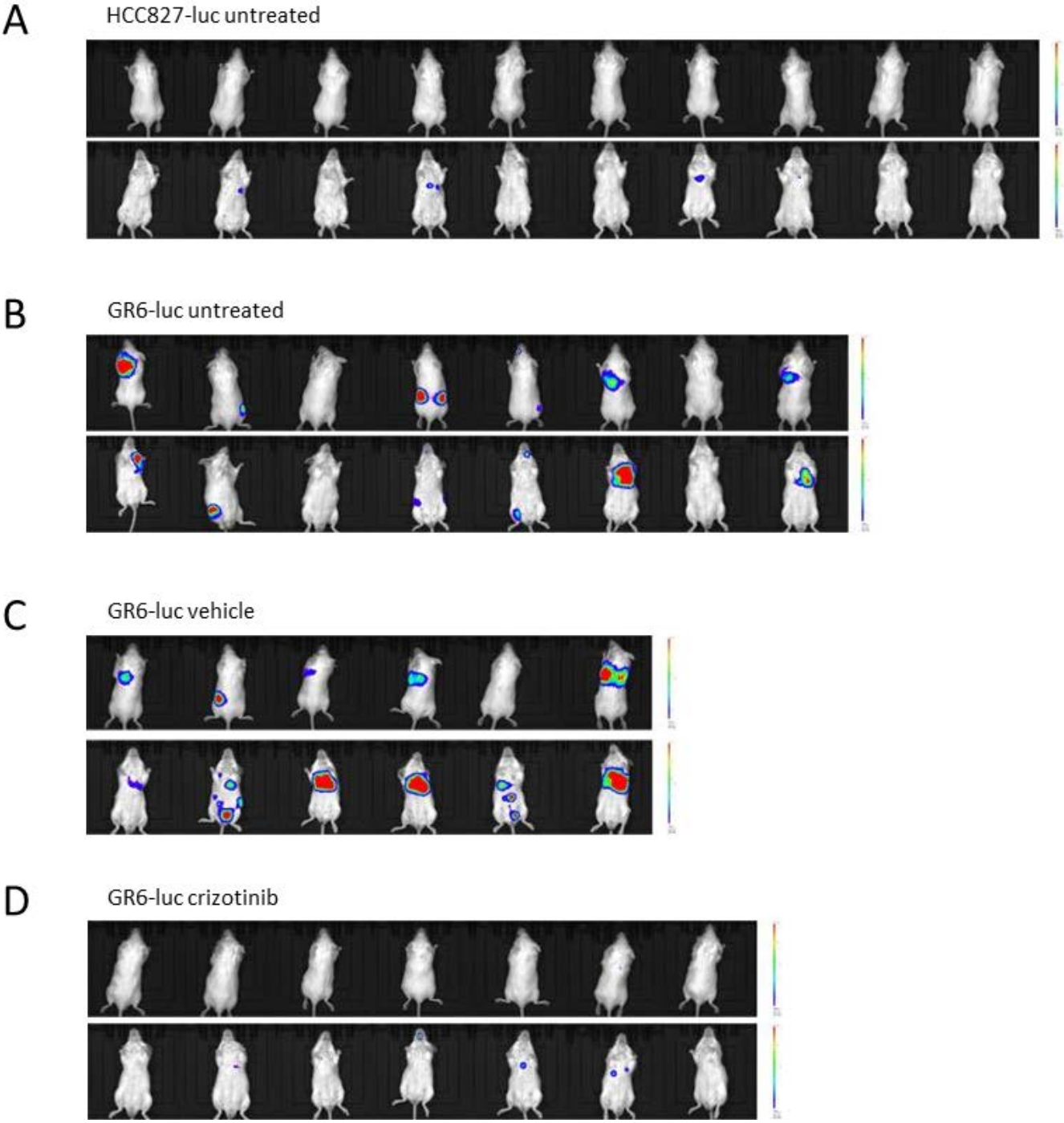
Supplementary Figure S1 : Effect of MET inhibition with a siRNA on anchorage independent growth of HCC827 and GR6 cells. Anchorage independent growth of HCC827 and GR6 cells transfected with the indicated siRNA was measured by counting clone formation in soft agar after 14 days of culture. Results are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Statistical significance was calculated by two-tailed Mann-Whitney (***) $P < .001$, ns non significant).



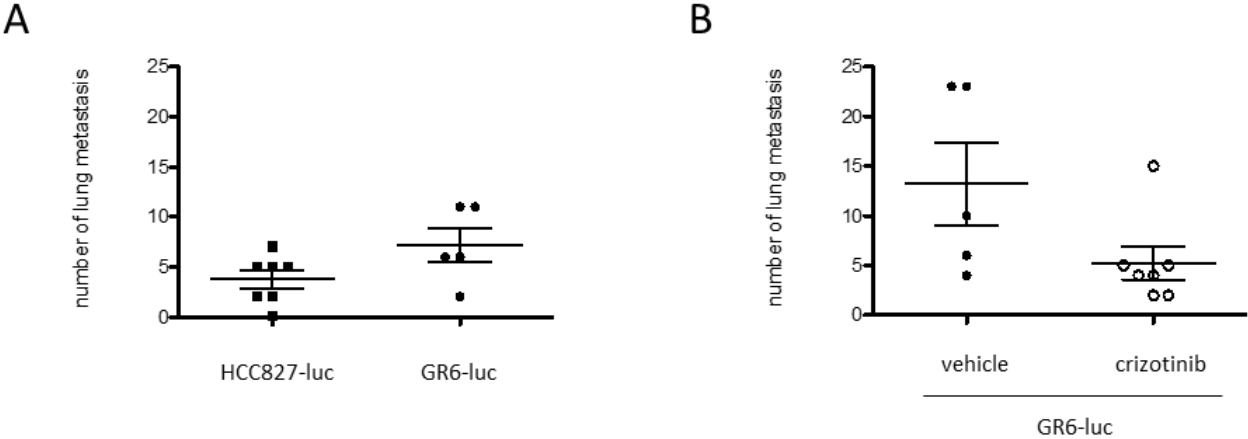
Supplementary Figure S2 : Bioluminescence of HCC827-luc and GR6-luc cells *in vitro*. Bioluminescence of HCC827-luc and GR6-luc cells were assessed *in vitro* by measuring average radiance at the bioluminescent peak in presence of luciferin for the indicating concentration of cells.



Supplementary Figure S3 : Bioluminescence imaging of metastases. A) and B) Bioluminescence imaging of all SCID mice 35 days after injection in the left ventricle of HCC827-luc or GR6-luc cells. **C) and D)** Bioluminescence imaging of all SCID mice, daily treated with crizotinib (50 mg/kg) or vehicle, 35 days after injection in the left ventricle of GR6-luc cells.



Supplementary Figure S4 : MET amplification increases lung metastases dissemination. A) Number of lung metastases assessed by histological analysis 35 days after injection of HCC827-luc or GR6-luc cells in the right ventricle of SCID mice. The mean number \pm SEM of metastases identified by histological analysis was represented. **B)** Number of lung metastases assessed by histological analysis 35 days after injection of GR6-luc cells in the right ventricle of SCID mice orally treated with crizotinib (50mg/kg) or vehicle. The mean number \pm SEM of metastases identified by histological analysis was represented.



Supplementary Table S1 : RT-qPCR primer sequences.

Target gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size (bp)
beta2 microglobulin (B2M)	GCTGGCGGGCATTCTGAAG	TGCTGGATGACGTGAGTAAACCTG	144
MET	TTTCAAATGGCCACGGGACAACACA	TGGGCTGGGGTATAACATTCAAGA	222
E-Cadherin (CDH1)	TTTGACGCCGAGAGCTACAC	GAATCGGGTGTTCGAGGGAAA	131
Vimentin (VIM)	AGAGAGGAAGCCGAAAACACC	CTGGATTTCTCTTCGTGGAGT	143
ZEB1	ATGACCTGCCAACAGACCAG	GCTTCAGGCCCCAGGATTT	117

Supplementary Materials

Western blot analysis and antibodies

For western blot analysis, 800000 cells were plated on 10 cm dishes in complete medium. In treatment experiments, drugs were added 24h later. The cells were lysed 48h after seeding in M-PER lysis buffer (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) with 1% HALT protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts). Protein concentrations were determined with the BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts). Equal amount of total proteins were separated on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10%) at 120 V for 2h, and proteins were transferred at 100 V for 1.5 hours on Immobilon-P polyvinylidene fluoride microporous transfer membranes (Millipore, Billerica, Massachusetts). Prestained broad-range molecular mass markers (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) were used as standards in each gel. Protein detection was performed using the ECL Western blotting detection Reagent (GE-Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) or SuperSignal West Dura (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) when required. The following antibodies were used at a 1:1000 dilution unless otherwise indicated : MET (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, 3148), phospho-MET (Tyr1234/Tyr1235) (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, 3126), EGFR (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, 2646), phospho-EGFR (Tyr1068) (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, 2236), AKT (Santa Cruz, sc-8312), phospho-AKT (Ser473) (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, 4060), ERK (Santa Cruz, Dallas, Texas, sc-154), phospho-ERK (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, 9106), GAPDH (Santa Cruz, Dallas, Texas, sc-32233). Anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, 115-035-146) and anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, 711-035-

152) secondary antibodies were diluted at 1:10000. Each experiment was repeated at least three times.

Quantitative real-time RT-PCR

Total RNA was extracted using the Nucleospin RNA/Protein Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's protocol and reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems, Foster City, California). Analysis of transcript relative fold copy number was carried out by quantitative real-time PCR using Fast SYBR Green mix (Applied Biosystems, Foster City, California) in an MX3005P instrument (Stratagene, San Diego, California) as described by the supplier, with specific primers listed in supplementary table S3. The relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The mRNA levels of each target gene were normalized to the levels of the housekeeping B2M gene and presented as fold induction relative to the control DMSO or the untreated HCC827 cell line depending on the experiment. Results were represented as means of at least three independent experiments.

RNA interference

For silencing, 300000 cells were incubated with 4.5 μ L Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California) mixed with 120 nM of a siRNA (Invitrogen, Carlsbad, California) targeting the genes of interest. The cells were then plated in a 6-well plate in a final volume of 1.5 mL of complete medium. Transfected cells were trypsinised after 24h soft agar assays.

The following siRNA were purchased from Life technology : Control Stealth siRNA negative control, MET [5'-CCGAGGGAAUCAUCAUGAAAGAUUU-3']. Each experiment was repeated at least three times.

MTT proliferation assays

At the indicated time point, cells were incubated for 2h with MTT (Invitrogen, Carlsbad, California) diluted at 0.5mg/ml in 200 μ l of medium at 37°C. The resultant formazan crystals were dissolved in isopropanolol. The absorbance resulting of the dye uptake in viable cells was detected at 540 nm with a Multiskan RC Microplate Reader (ThermoLabsystems, Waltham, Massachusetts) with a reference wavelength of 620 nm.

Each assay consisted of three replicate wells. Results were represented as means optic density of at least three independent experiments.

Agar clones count

For each anchorage independent growth assay, 4 fields per well at 2 different z stacks were randomly photographed with Zeiss Axio Vert.A1 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a Zeiss N-Acroplan 5x objective (numerical aperture [NA]0.15, Zeiss, Oberkochen, Germany). Colonies of each field were counted using Fiji software (NIH, Bethesda, Maryland). Results were illustrated with representative fields of clones and the means number of clones per field of three independent experiments.

Time lapse microscopy

Time-lapse microscopy was performed on a Zeiss AxioObserverZ1 fluorescence microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a 10x ECPLAN (numerical aperture [NA] 0.3), an Axio mRm camera, a Lambda DG4 excitation source (Sutter Instrument Company, Novato, California), a DsRed Filter (Zeiss Filter Set 43HE, Zeiss, Oberkochen, Germany) and an incubation Unit (XL Unit, Pecon, Erbach, Germany). The interior of the incubator surrounding the entire microscope system was heated to 37°C and the CO₂ level was regulated to 5%. Cells were labeled with DiIC12 (17µg/ml) and seeded at 30000 per well in 15µ slide 8 wells (Ibidi, Martinsried, Germany) with complete medium 24h before microscopy. Images were acquired with the Zen software (Zeiss, Oberkochen, Germany) at a rate of 1 image per time interval of 10 minutes during 6h. The Plugin MTrack2 implemented in the Fiji software (NIH, Bethesda, Maryland) enabled to obtain the trajectory (xy-path) of each cell. Cell migration was assessed as the total path length in micrometers

Stable transfection procedure

HCC827 or HCC827GR6 cells were plated on 6-well plates (800000 per well) and transfected the next day with pGL4.51 vector and FuGENE HD tranfection reagent (Promega, Madison, Wisconsin ; 2 µg DNA / 8 µl FuGENE reagent in 2 mL complete medium). After 24h of incubation, cells were cultivated in complete medium with neomycin (600 µg/ml) for 36 days. At the end of the selection step, the stably transfected cell lines were named

respectively HCC827-luc and HCC827-GR6-luc and maintained in complete medium without neomycin.

***In vitro* bioluminescence imaging**

Bioluminescence of HCC827-luc and GR6-luc cell lines were evaluated in 96-wells plate (BD bioscience, Franklin Lakes, New Jersey) at the indicated concentration in 25 ul of complete medium per well. Luciferin at 0.3 mg/ml in 25ul of PBS was added in each well. A bioluminescence imaging was immediately performed with an IVIS Lumina XR apparatus (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts) at an automatically determined exposure time and repeated every 5 minutes during 30 minutes. Average radiance (photons⁻¹sec⁻¹cm⁻²sr⁻¹) of each well at luminescent peak was quantified using IVIS Living Image version 4.3.1 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts) to describe the bioluminescence of both cell lines.

***In vivo* bioluminescence imaging**

Mice were anesthetized with isoflurane 2% and 250000 HCC827-luc or GR6-luc cells suspended in 100ul of PBS were injected into their heart. Left or right ventricle injection were controlled by bioluminescence imaging with an IVIS Lumina XR spectrum 40 minutes after intracardiac injection and 10 minutes after subcutaneous administration of luciferin 150 mg/kg. 35 days after the intracardiac injection, anesthetized mice were injected subcutaneously with luciferin 150 mg/kg, and bioluminescence imaging was immediately performed every 5 minutes during 30 minutes with automatically determined time exposure. Average radiance of each mouse at luminescent peak was calculated for all experiments using IVIS Live imaging.

Immunohistochemistry

IHC was performed using BenchMark XT (Ventana, Oro Valley, Arizona) automated IHC stainer using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) revelation and hematoxylin counter-staining (Bluing Reagent, Ventana, Oro Valley, Arizona). MET antibody (Ventana, Oro Valley, Arizona, 790-4430, SP44 clone), prediluted by the manufacturer, was incubated 16 seconds after basic CC1 pre-treatment. Phospho-MET (Tyr1234/Tyr1235) antibody (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts 3077, D26 clone) was incubated 32 seconds at a 1/100 dilution with basic CC1 (Ventana, Oro Valley, Arizona) and protease 3 (Ventana, Oro Valley, Arizona)

endopeptidase pre-treatment. E-cadherin antibody (Invitrogen, Carlsbad, California, 180223, 4A2C7 clone) is diluted at 1/25 with CC1, and ZEB1 antibody (Novusbio, Littleton, Colorado, 23484, 2A8A6 clone) at 1/500. Vimentin (Ventana, Oro Valley, Arizona, 790-2917, V9 clone) antibody is pre-diluted by the manufacturer. Immunohistochemistry was evaluated using the H-score method, corresponding to the percentage of stained tumoral cells at each intensity. The staining intensity was evaluated within a scale ranging from 0–3 and divided into 4 categories, no staining : 0, weak : 1, intermediate : 2 and strong staining : 3. H-score was defined as a continuous variable ranging from 0 to 300 and was determined using the formula : $1 \times (\text{percentage of intensity score 1 cells}) + 2 \times (\text{percentage of intensity score 2 cells}) + 3 \times (\text{percentage of intensity score 3 cells})$.

Patients and clinical data analysis

We previously published a multicentric retrospective observational cohort of patients with a metastatic EGFR mutated NSCLC, exhibiting *MET* amplification or high *MET* overexpression on a re-biopsy performed after TKI EGFR progression identified among 15 French centers (Article 1). Inclusion criteria in this study were documented diagnosis of metastatic NSCLC, detection of an *EGFR* mutation on tumor sample at diagnosis, treatment with at least one EGFR TKI and detection of *MET* overexpression or *MET* amplification after the time of clinical or radiological progression on EGFR TKI. The study was approved by a national ethic committee (CEPRO 2016-001). *MET* overexpression was defined as a 3+ *MET* Immunoscore ($\geq 50\%$ of tumor cells showing high-intensity staining) on *MET* immunochemistry using *MET* monoclonal antibody (clone SP44 Ventana). *MET* amplification was defined by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) as a mean *MET* GNC per cell ≥ 6 , or a Ratio *MET*/CEP7 ≥ 2 , or the presence of *MET* clusters. In the present work, the time to new metastasis after EGFR TKI tumoral progression was measured from the date of EGFR TKI RECISTv1.1 progression to the date of first progression with a new lesion after EGFR TKI progression. The time to new metastasis after EGFR TKI tumoral progression were described with Kaplan-Meier Method and compared between the study groups with log-rank test. Hazard ratios were obtained with Cox model. Bivariate comparisons between the two study groups (amplified vs non amplified) were made using Student t test for Gaussian continuous variables, Mann-Whitney U test for non-Gaussian continuous, Chi-Square test (or Fisher's

exact test when the expected cell frequency was <5) for categorical variables, as appropriate. All statistical testing was conducted at the 2-tailed α level of 0.05. Data were analyzed with GraphPad Prism software version 7 (GraphPad software, San Diego California).

Article 3 (en révision, La revue des maladies respiratoires) : Les mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de *MET*

Sous-titre : Une nouvelle opportunité thérapeutique dans le cancer du poumon

Simon BALDACCI^{1, 2}, Zoulika KHERROUCHE¹, Clotilde DESCARPENTRIES³, Marie WISLEZ⁴, Eric DANSIN⁵, Alessandro FURLAN^{1, 6}, David TULASNE¹, Alexis B. CORTOT^{*1,2}.

¹ Univ. Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161 - M3T – Mécanismes de tumorigenèse et thérapies ciblées

² Univ. Lille, CHU Lille, Service de Pneumologie et Oncologie Thoracique, Siric OncoLille

³ CHU Lille, Plateforme de Biologie Moléculaire des cancers, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire

⁴ AP-HP, GH HUEP, Hôpital Tenon, Service de Pneumologie Paris, France. GRC n°04, Theranoscan, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Paris, France.

⁵ CLCC Oscar Lambret, Lille, Département de Cancérologie Cervico-Faciale & Thoracique

⁶ Univ. Lille, CNRS UMR 8523 PhLAM, Equipe de Biophotonique Cellulaire Fonctionnelle,

Titre court : Les mutations de MET dans le cancer du poumon

*Auteur-correspondant : Alexis Cortot, Service de Pneumologie et Oncologie Thoracique, Hôpital Calmette, CHRU de Lille, 59000, Lille, France. Alexis.CORTOT@CHRU-LILLE.FR

S.B. a reçu des financements permettant une participation à des formations, des communications, des congrès et des réunions de groupe d'expert de la part de Pfizer, GSK, Lilly, et de Astrazeneca

A.B.C. a reçu des honoraires de Novartis, Pfizer, Astra-Zeneca, Boehringer-Ingelheim, MSD, BMS, Roche

E.D. a reçu des honoraires pour la participation aux comités scientifiques de Novartis, BMS, Lilly et de Pfizer et un financement de Roche pour une étude Clinique (2014)

Les autres auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt.

Résumé

(Nombre de mots : 124)

Les mutations conduisant à un saut de l'exon 14 du gène codant pour le récepteur tyrosine kinase (RTK) MET constituent une nouvelle classe d'altérations moléculaires décrites dans différentes pathologies néoplasiques dont les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC). Ces mutations, appelées MET Δ 14 semblent associées à une efficacité des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) de MET. Cette synthèse revient sur les mécanismes moléculaires responsables du saut de l'exon 14 de *MET* ainsi que sur les conséquences de la perte de cet exon sur l'activité du récepteur. Nous décrivons ensuite les caractéristiques cliniques des patients porteurs d'une mutation MET Δ 14. Enfin, nous abordons les problématiques liées à la détection de ces mutations dans les cancers pulmonaires, et la nécessité d'anticiper la résistance aux inhibiteurs de MET.

Mots clés : Cancer du poumon, MET, Récepteur tyrosine kinase, Thérapies ciblées

Titre : Les mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de *MET*

Title : *MET* exon 14 splicing sites mutations : a new therapeutic opportunity in lung cancer

Abstract

(107 words)

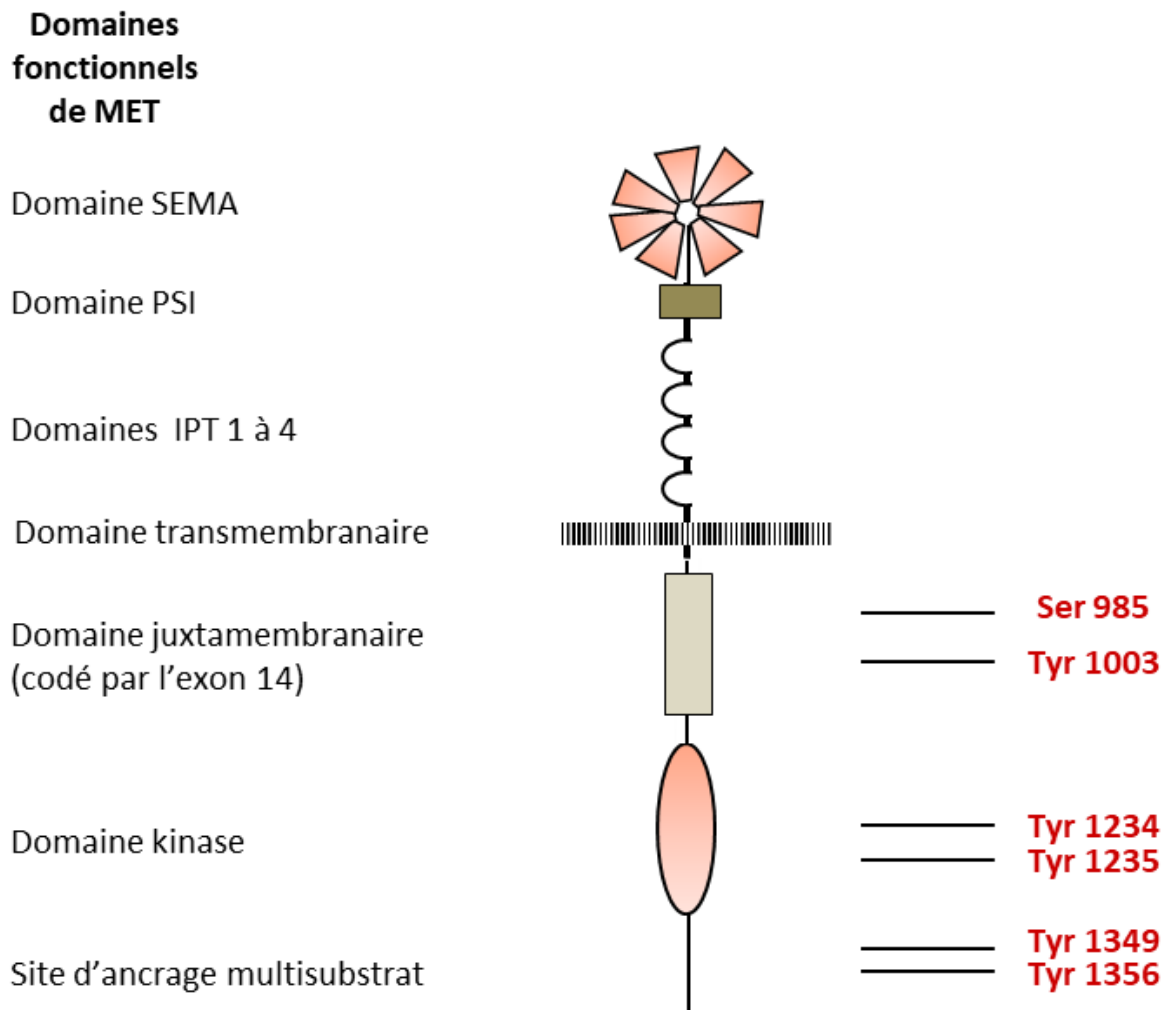
The mutations leading to *MET* exon 14 skipping represent a new class of molecular alterations described in various cancers including non-small cell lung cancer (NSCLC). Several cases of NSCLC carrying such alterations and displaying objective response to MET tyrosine kinase inhibitors (TKIs) were recently published. This review summarizes the molecular mechanisms responsible for *MET* exon 14 skipping as well as the consequences of the loss of this exon on the receptor activity. We also describe the clinical characteristics of patients with $MET\Delta 14$ mutations. Finally, we address the issues related to the detection of these mutations in lung cancers, and the need to anticipate resistance to MET inhibitors.

Keywords : Lung cancer, MET, Tyrosine kinase receptor, Targeted-therapies

Le récepteur MET

MET est un récepteur tyrosine kinase (RTK) principalement exprimé dans les cellules d'origine épithéliale. Il est activé par son ligand l'HGF (Hepatocyte Growth Factor également appelé Scatter Factor) [1]. MET est constitué de deux sous-unités α et β reliées par un pont disulfure. Le domaine extracellulaire du récepteur comprend un domaine SEMA en N-terminal (formé de la sous-unité α ainsi que des premiers acides aminés de la sous-unité β), un domaine plexine-semaphorine-integrine (PSI) et 4 domaines immunoglobulin-like (IPT). La région intracellulaire contient un domaine juxtamembranaire, un domaine tyrosine kinase et une queue C-terminale (figure 1) [2,3]. L'interaction de MET avec son ligand provoque sa dimérisation et son auto-phosphorylation sur deux résidus tyrosine du domaine catalytique (Y1234 et Y1235). D'autres résidus tyrosine, situés en dehors du domaine kinase, comme la tyrosine 1003 dans le domaine juxtamembranaire et les tyrosines 1349 et 1356 de la queue C-terminale, sont à leur tour phosphorylés (figure 1) [4,5]. La phosphorylation des résidus situés en C-terminal permet le recrutement de plusieurs effecteurs de signalisation importants comme GAB1, GRB2, SHC, PI3K, SRC, STAT3 et la PLC γ . La voie HGF/MET est essentielle au développement embryonnaire. Elle est en particulier nécessaire à la formation des organes épithéliaux, du foie, du placenta, des muscles, des neurones et des alvéoles pulmonaires [6–10]. Chez l'adulte, elle joue par ailleurs un rôle important dans plusieurs processus physiologiques comme la cicatrisation cutanée ou la régénération hépatique [11–13].

Figure 1 : Représentation des principaux domaines fonctionnels du récepteur MET. Les résidus phosphorylables sont indiqués en rouge.



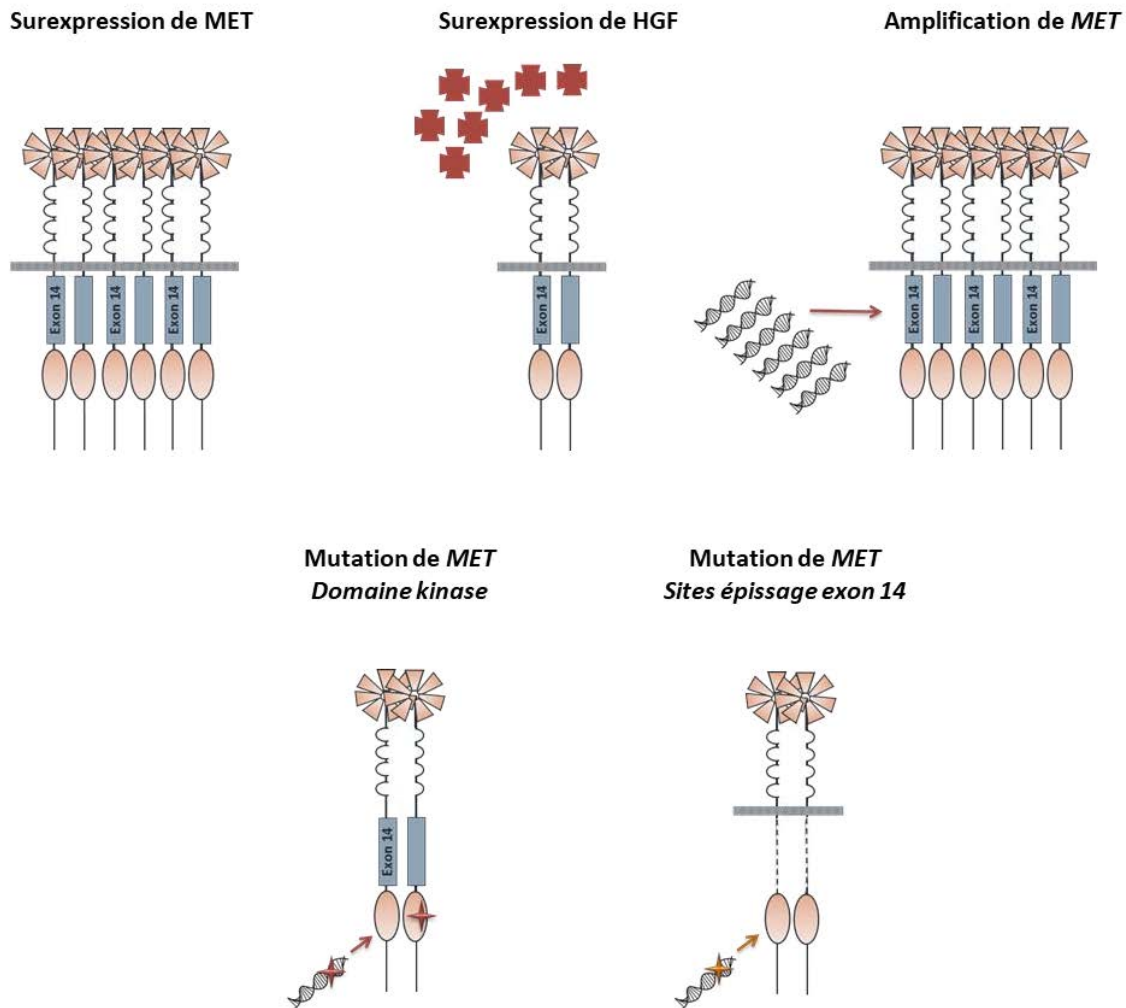
Les dérégulations de MET dans les cancers

En pathologie humaine, une activation de la voie HGF/MET est observée dans de nombreux cancers. Plusieurs mécanismes de dérégulation de cette voie peuvent être impliqués tels que la surexpression de MET ou de son ligand, l'amplification du gène codant *MET* ou encore les mutations activatrices du domaine kinase du récepteur (figure 2). La surexpression de l'HGF ou de MET est constatée dans de nombreux cancers et se trouve fréquemment associée à un mauvais pronostic [14–20]. La sécrétion d'HGF par la tumeur est de plus associée à une résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) d'EGFR dans les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) EGFR mutés [21,22]. La valeur prédictive de la

surexpression de MET d'une efficacité des inhibiteurs de MET n'a pas été démontrée [23]. L'amplification du gène *MET* est, quant à elle, retrouvée dans 1 à 5% des cancers gastriques et pulmonaires [24–26]. Cette altération est responsable d'une synthèse massive du récepteur, ce qui provoque son activation, indépendamment de la présence de son ligand. Plusieurs études préliminaires suggèrent que l'amplification de *MET* est associée à une efficacité des inhibiteurs de MET dans les CBNPC [27–29]. Par ailleurs, l'amplification de *MET* est un mécanisme de résistance aux inhibiteurs d'EGFR dans les CBNPC EGFR-mutés [30]. Enfin, les mutations du domaine kinase de MET ont d'abord été découvertes au niveau germlinal chez des patients atteints de cancers rénaux héréditaires [31]. Par la suite, des mutations somatiques du domaine kinase de MET ont été identifiées dans des cancers rénaux sporadiques, et plus rarement dans des cancers pulmonaires et ORL. Ces mutations, comme la D1228N, la Y1235D et la M1250T, sont capables d'induire une activation constitutive de l'activité kinase de MET et semblent associées à une efficacité des inhibiteurs de MET [32,33].

Le développement du *screening* moléculaire massif en cancérologie a récemment permis la mise en évidence, dans les CBNPC, d'une nouvelle classe de mutations dérégulatrices de MET. Ces mutations, appelées MET Δ 14, sont situées à proximité des jonctions intron-exon de part et d'autre de l'exon 14. Elles touchent des sites critiques de l'ARN pré-messager de MET, normalement reconnus par des ribonucléoprotéines nucléaires lors du processus d'épissage (point de branchement, séquence polypyrimidique, sites d'épissage donneurs et accepteurs). Une altération de ces sites aboutit à un saut de l'exon 14 au cours de son épissage. Plusieurs cas de réponses tumorales aux ITK de MET ont de plus été décrits chez des patients présentant une mutation MET Δ 14.

Figure 2 : Les différents modes de dérégulation de la voie HGF/MET dans les cancers.



La découverte des mutations responsables d'un saut de l'exon 14 de MET dans les CBNPC

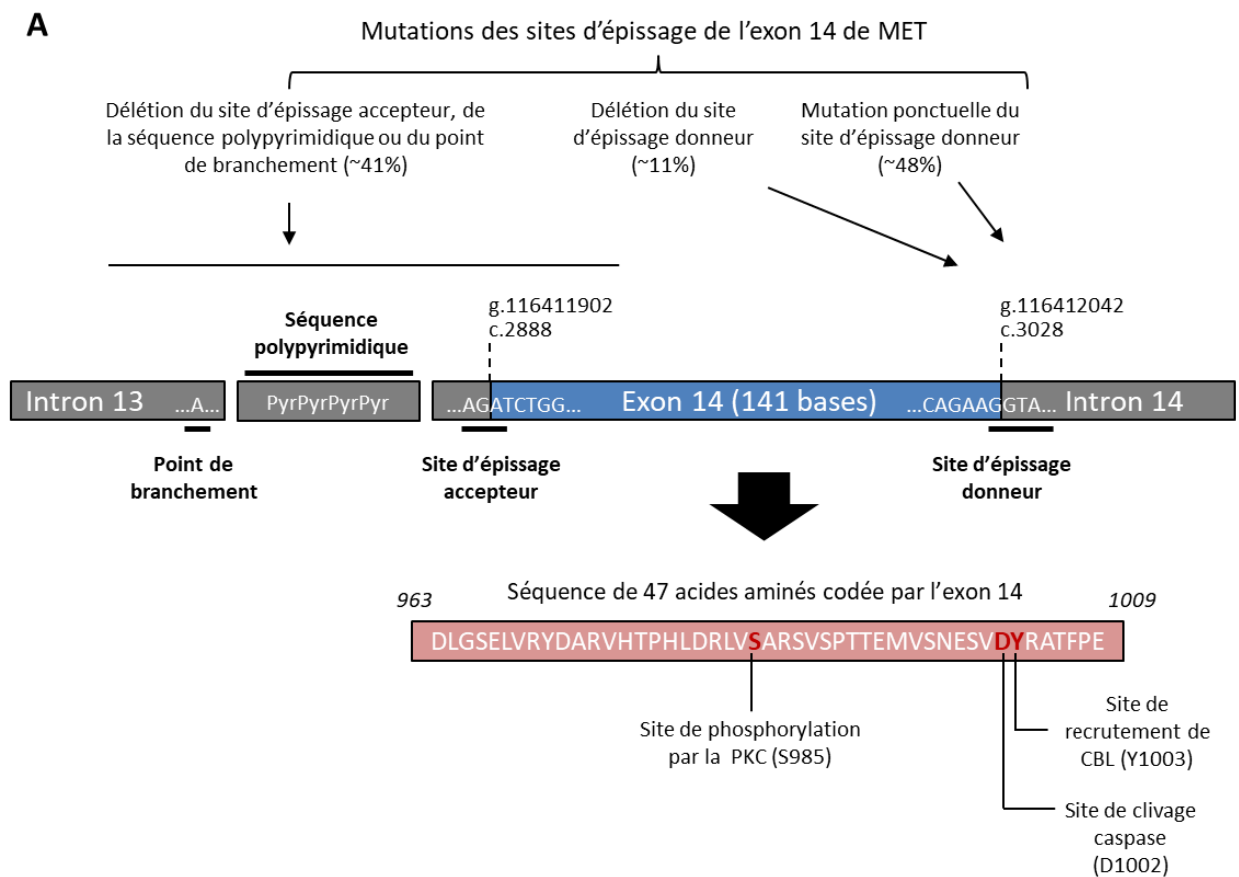
En 2003, Ma et al. rapportent pour la première fois l'existence de mutations introniques en amont de l'exon 14 de MET susceptibles d'induire un épissage alternatif de l'ARN messenger, responsable d'un saut de l'exon 14 [34]. L'analyse de l'ADN complémentaire d'une cohorte de 127 CBNPC a ensuite permis de mettre en évidence cet épissage et la perte de l'exon 14 chez 1 patient [35]. Le lien entre mutations somatiques affectant les sites d'épissage encadrant l'exon 14 et saut d'exon a finalement été formellement démontré en 2006 grâce à la comparaison des séquences d'ADN génomique et d'ADN

complémentaire de 2 biopsies d'adénocarcinome bronchique et de la lignée cellulaire issue d'un CBNPC, NCI-H596 (ATCC HTB-178) [36]. Par ailleurs, d'autres mutations ont été décrites, affectant cette fois directement l'exon 14 et non les sites d'épissage. Toutefois ces mutations dont la prévalence reste mal connue ont des conséquences fonctionnelles très limitées, ne provoquent pas d'activation de MET, et ne semblent pas associées à une efficacité des inhibiteurs de MET. Nous ne les aborderons pas dans cette revue [37–39].

En 2014, la caractérisation de 230 adénocarcinomes pulmonaires par séquençage de l'exome combiné au séquençage du transcriptome a révélé un taux relativement élevé (environ 3%) de mutations somatiques survenant sur les sites d'épissage de l'exon 14 et conduisant à un saut de l'exon 14 [40]. Un an plus tard, l'analyse de l'ADN génomique de 38028 tumeurs par séquençage de nouvelle génération a confirmé la présence de ces mutations dans 3% des adénocarcinomes pulmonaires, mais également dans 2,3 % des tumeurs pulmonaires non adénocarcinomateuses, et dans 0,4% des gliomes. Cette étude a aussi mis en évidence une grande diversité au sein de ces mutations avec l'identification de 126 variants [41]. Plus de 160 altérations différentes, touchant des séquences consensus nécessaires à un épissage normal, ont depuis été répertoriées (figure 3A) [42]. A l'extrémité 5' de l'exon 14, ces anomalies correspondent en majorité à des délétions, à des insertions, ou à des modifications complexes combinant à la fois des délétions et insertions. Elles touchent principalement le site d'épissage accepteur, le point de branchement ou la séquence polypyrimidique. Les altérations situées à l'extrémité 3' de l'exon 14 sont principalement des mutations ponctuelles affectant le site donneur d'épissage. Toutes ces altérations sont susceptibles d'entraîner le saut de l'exon 14 lors de l'épissage.

Figure 3 : Implication de l'exon 14 dans la régulation de MET

(A) Schéma de l'exon 14 situé entre les positions génomiques g.116411902 et g.1164122042 (*Homo sapiens* chromosome 7, GRCh37, GenBank: CM000669.1) ou entre les positions c.2888 et c.3088 (transcript ID ENST00000397752) de l'ADN complémentaire. Le point de branchement, la séquence polypyrimidique et les sites accepteur et donneur d'épissage sont représentés. Entre parenthèse : prévalence de chaque type de mutation MET Δ 14 dans Frampton *et al.* parmi l'ensemble de patients muté MET Δ 14. Sur la séquence d'acides aminés codée par l'exon 14, les principaux sites de régulation négative sont respectivement représentés en rouge.



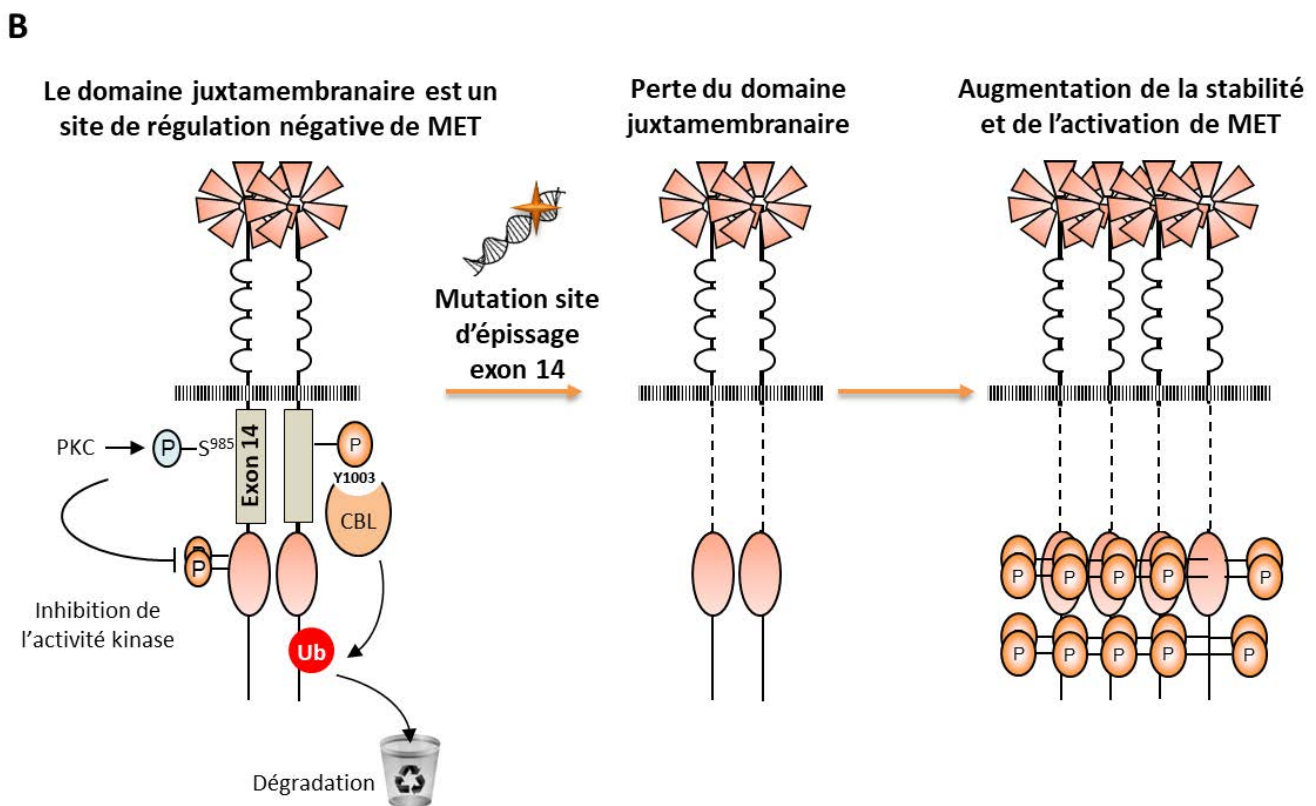
Conséquences fonctionnelles du saut de l'exon 14 sur la régulation de MET

Bien que l'étude des mutations induisant la perte de l'exon 14 soit relativement récente en cancérologie, l'implication du domaine juxtamembranaire codé par cet exon dans le contrôle de l'activité de MET est connue depuis les années 1990. En effet plusieurs sites de régulation négative de MET ont été caractérisés dans la région du domaine juxtamembranaire codée par l'exon 14.

Le premier mécanisme de régulation négative identifié dans le domaine juxtamembranaire est la phosphorylation de la sérine 985 (figure 3A). Cette phosphorylation inhibe la phosphorylation des résidus tyrosine du domaine kinase et C-terminal de MET, et permet ainsi de contrôler la réponse cellulaire au ligand, l'HGF [43]. La sérine 985 est phosphorylée par la protéine kinase C (PKC) et déphosphorylée par la phosphatase 2A (PP2A) [44]. Ainsi, après une lésion hépatique, l'activation de MET par l'HGF, requise pour la régénération tissulaire, est associée à une diminution de la phosphorylation de la sérine 985 [45]. Ceci suggère l'implication de la sérine 985 dans la régulation physiologique de l'activité de MET. La délétion de l'exon 14 pourrait donc conférer une résistance aux signaux inhibiteurs transmis par la PKC et ainsi favoriser l'activation de MET (figure 3B).

Figure 3 : Implication de l'exon 14 dans la régulation de MET

(B) Schéma du récepteur MET, activé par son ligand l'HGF. Le domaine juxta-membranaire est le site de plusieurs mécanismes de régulation négative telles que la phosphorylation PKC-dépendante de la sérine 985 qui conduit à l'inhibition de l'activité tyrosine kinase du récepteur, ou la phosphorylation ligand dépendante de la tyrosine 1003 qui entraîne le recrutement de l'E3-ubiquitine ligase sur le site DpYR et provoque ainsi l'ubiquitination suivie de la dégradation lysosomale du récepteur. La délétion du domaine juxta-membranaire codé par l'exon 14 pourrait conduire à une augmentation de la stabilité du récepteur et de son activité tyrosine kinase. Le ciblage de MET par des inhibiteurs de tyrosine kinase tel que le crizotinib, le capmatinib et le cabozantinib pourrait constituer une stratégie thérapeutique efficace chez les patients atteints d'une tumeur porteuse d'une mutation perte de l'exon 14 de MET.



Le deuxième résidu du domaine juxtamembranaire impliqué dans l'inhibition de MET est la tyrosine 1003 (figure 3A). Après l'activation de MET, la Tyr1003 est phosphorylée permettant le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase CBL (Casitas B-lineage Lymphoma) *via* notamment son domaine TKB (Tyrosine Kinase Binding domain). Ceci entraîne une ubiquitination de MET et induit la dégradation du récepteur (figure 3B) [46]. Une mutation de la Tyr1003 est suffisante pour bloquer l'interaction de MET avec CBL et son ubiquitination.

Ceci conduit à une stabilisation du récepteur et à un potentiel oncogénique plus important de la forme MET mutée Tyr1003 comparée à la forme sauvage [47].

Le troisième site de régulation négative présent dans l'exon 14 est un site impliqué dans les clivages de MET par les caspases durant l'apoptose. Sous l'effet d'un stress et en l'absence de ligand, MET est d'abord clivé sur un site consensus caspase au niveau de sa queue C-terminale. Ce clivage initial est suivi d'un second clivage caspase au niveau de l'acide aspartique 1002 situé dans un motif ESVD codé par l'exon 14 (figure 3A). Ceci permet la formation d'un fragment cytoplasmique C-terminal de 40 kDa (p40-MET) contenant le domaine tyrosine kinase [48,49]. Ces clivages caspases diminuent fortement la quantité de récepteur MET pleine longueur fonctionnel pendant l'apoptose. Ils permettent également de former un fragment de MET capable d'amplifier l'apoptose en favorisant la perméabilisation mitochondriale [50]. Les clivages caspases de MET constituent ainsi un mécanisme de régulation négative supplémentaire, situé dans le domaine juxtamembranaire et perdu par épissage de l'exon 14.

La partie du domaine juxtamembranaire de MET codé par l'exon 14 comprend donc plusieurs sites qui permettent de prévenir l'activation de MET ou de convertir MET en un facteur pro-apoptotique. L'épissage de cet exon pourrait donner aux cellules porteuses d'une mutation MET Δ 14 un avantage en termes de prolifération et de survie.

Caractéristiques histologiques, cliniques, et moléculaires des cancers présentant des mutations induisant un saut de l'exon 14 de MET

Les mutations MET Δ 14 ont été observées dans différents types de tumeurs dont les cancers pulmonaires (2.6% à 22%), les glioblastomes (0.4%) et plus rarement dans d'autres pathologies néoplasiques (sarcomes des tissus mous, carcinomes urothéliaux, carcinomes à cellules de Merkel, cortico-surrénales, cancers du rein, carcinomes hépatocellulaires)

[41,42,51]. Parmi les cancers pulmonaires, le taux de mutations des sites d'épissage de l'exon 14 semble particulièrement élevé dans les adénocarcinomes (2.6 à 3.2%) [41,52,53], les tumeurs sarcomatoides (2.6% à 31.8%) [39,42,52–54], et les carcinomes adénoquameux (4 à 8,2%) [42,52]. Les mutations MET Δ 14 ont également été observées à des fréquences plus faibles dans d'autres tumeurs pulmonaires : les cancers épidermoïdes (2,1%), les carcinomes à grandes cellules (0.8%), les CBNPC sans autre spécificité, et les cancers bronchiques à petites cellules [41,42,52,53,55].

Schrock *et al.* ont décrit les caractéristiques cliniques d'une série de 298 patients atteints d'un cancer pulmonaire avec une mutation des sites d'épissage de l'exon 14 de *MET*. Il s'agit de patients âgés (âge médian : 73 ans) en majorité de sexe féminin (60%). Dans cette étude, les données concernant le statut tabagique n'étaient disponibles que pour 36 patients dont 25 étaient non-fumeurs. La faible charge mutationnelle observée dans les tumeurs MET Δ 14, suggère effectivement qu'une proportion importante de ces patients pourraient être non-fumeurs [42]. D'autres études retrouvent des caractéristiques cliniques similaires à celles rapportées dans l'étude de Schrock, se traduisant principalement par un âge plus élevé que dans les autres CBNPC, un sex-ratio proche de 1, et une proportion de non-fumeurs de 30 à 50%. L'impact des mutations MET Δ 14 sur la survie n'a pas encore été étudié de façon exhaustive. Tong *et al.* ont cependant réalisé une analyse de survie sur 687 patients atteints de CBNPC de différents stades. Dans cette étude, l'analyse multivariée montre que les mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de *MET*, l'amplification de *MET* et le stade avancé sont des facteurs indépendants de mauvais pronostic [53]. Enfin, dans les populations asiatiques atteintes d'adénocarcinome bronchique, la fréquence de mutations MET Δ 14 semble plus faible que dans la population caucasienne (0.9 à 1.8%) [56,57].

Les mutations entraînant la perte d'exon 14 ont été détectées principalement par des techniques recherchant de façon multiplexée de nombreuses autres altérations génétiques

[36,37,41,42,51,54,58–62]. Dans la plupart des cas, ces mutations ne sont pas associées à d'autres altérations de drivers oncogéniques comme les mutations *EGFR*, *KRAS*, *HER2*, ou les réarrangements impliquant les gènes *ALK*, *ROS1*, et *RET*. Plusieurs publications ont néanmoins observé une association fréquente avec certaines altérations génétiques touchant la voie p53. Par exemple, dans l'étude de Schrock *et al.*, 34.6% des tumeurs avec une mutation des sites d'épissage de l'exon 14 présentaient une amplification de *MDM2* [42]. Plus rarement des mutations de *BRAF*, de *KRAS* ou de la *PI3KCA* ont été détectées en association avec des mutations *MET*Δ14 [52,53].

Plusieurs travaux ont décrit une association entre les mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de *MET* et l'amplification de *MET*. Grâce à une analyse NGS, Awad *et al.* ont par exemple évalué le nombre de copies de *MET* dans des CBNPC de différents stades. Dans cette étude, un ratio *MET*/chromosome 7 (*CEP7*) supérieur à 3 définissait un gain de copie de *MET* considéré comme élevé, tandis qu'un ratio compris entre 1 et 3 représentait un gain de copie considéré comme bas. Avec ces critères, un gain élevé de copie de *MET* a été observé chez 21% des patients avec une mutation des sites d'épissage de l'exon 14 et un gain faible chez 29% [52]. De façon intéressante, le ratio *MET/CEP7* était significativement plus élevé dans les CBNPC porteurs d'une mutation *MET*Δ14 de stade IV comparés aux stades I-III, suggérant que l'amplification de *MET* pourrait favoriser la progression des tumeurs *MET*Δ14. Tong *et al.* ont également mis en évidence une association significative entre les mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de *MET* et l'augmentation du nombre de copies de *MET* définie en FISH par un nombre de copies de *MET* ≥ 5 , un ratio *MET/CEP7* ≥ 2 ou la présence de cluster de *MET* [53]. Enfin Schrock a observé par NGS une prévalence relativement élevée de l'amplification de *MET* en cas de mutation de perte de l'exon 14 de *MET* (14.8%) [42].

Comme la perte de l'exon 14 de *MET* empêche la dégradation du récepteur, une augmentation de l'expression de *MET* sur les prélèvements tumoraux était attendue. Tong *et*

al. ont ainsi montré une association significative entre les mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de *MET* et l'intensité du marquage en IHC de MET [53]. Cependant, il est important de noter qu'au moins une mutation des sites d'épissage de l'exon 14 de *MET* a été détectée dans un prélèvement tumoral avec un faible niveau d'expression de MET en IHC [52].

Les mutations induisant un saut de l'exon 14 de MET, un biomarqueur prédictif de l'efficacité des inhibiteurs de MET ?

MET est perçu comme une cible potentielle pour le traitement de plusieurs cancers. Plus de 300 essais cliniques sont actuellement en cours pour évaluer l'efficacité et la tolérance de thérapies dirigées contre MET, ou contre son ligand l'HGF. Bien que plusieurs études évaluant des approches thérapeutiques ciblant MET dans des populations non sélectionnées ont rapporté des résultats décevants, des données récentes suggèrent que des inhibiteurs de MET comme le crizotinib (ITK ciblant à la fois MET, ALK et ROS1, et disposant d'une AMM dans le traitement des cancers pulmonaires réarrangés ALK ou ROS1) pourraient être actifs contre certaines tumeurs présentant une amplification de *MET* [29]. La découverte des mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de MET a rapidement conduit à évaluer l'efficacité des inhibiteurs de MET dans ces tumeurs, d'abord de façon sporadique puis dans le cadre d'essais cliniques évaluant différents ITK MET comme le crizotinib, le capmatinib, le tepotinib ou le savolitinib (*tableau 1*).

Tableau 1 : essais cliniques ciblant les CBNPC avec des mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de MET (ClinicalTrial.gov juillet 2017)

Inhibiteur (DCI)	Autre dénomination	Compagnie	Cible	Phase	Inclusion	Numéro d'identification	Recrutement	Critère de jugement principal
Capmatinib	INC 280/INCB 028060	Novartis	MET	II	CBNPC de stade IIIB/IV avec mutation de MET ou augmentation du nombre de copie de MET ayant reçu au moins un traitement systémique	NCT02414139	en cours	Taux de réponse
Capmatinib	INC 280/INCB 028060	Novartis	MET	II	CBNPC de stade IV avec mutation des sites d'épissage de l'exon 14 de MET déjà traité par inhibiteur de MET	NCT02750215	en cours	Taux de réponse
Tepotinib	MSC2156119J	Merck	MET	II	Adénocarcinome pulmonaire de stade IIIB/V avec mutation des sites d'épissage de l'exon 14 de MET en 2 ^{ème} ou 3 ^{ème} ligne	NCT02864992	en cours	Taux de réponse
Glesatinib	MGCD 265	Mirati Therapeutics	MET/Axl/Tie2/VEGFR1/2/3/ROK	II	CBNPC avancé porteur d'une altération génétique activatrice de MET (mutation ou amplification de MET) ayant reçu au moins une ligne de chimiothérapie	NCT02544633	en cours	Nombre de patients présentant une diminution de la taille tumorale
Sitravatinib	MGCD 516	Mirati Therapeutics	MET/c-KIT/Axl/PDGFR/TKV/RET/IGF1-R	Ib	Tumeurs solides méastatutiques réfractaires porteurs d'altérations génétiques activatrices de MET	NCT02219711	en cours	Dose limitante, pic de concentration plasmatique
Crizotinib	PF 02341066	Pfizer	ALK/ MET/ ROS1	II	Cohorte Acse CBNPC MET muté	NCT02034981	en cours	Taux de réponse
Crizotinib	PF 02341066	Pfizer	ALK/ MET/ ROS1	I	Tumeurs solides avancées avec une altération de MET, ALK ou ROS1 sensibilisant au crizotinib (dont mutation des sites d'épissage de l'exon 14 de MET).	NCT00585195	en cours	Dose maximum tolérée
Crizotinib	PF 02341067	Pfizer	ALK/ MET/ ROS1	II	Évaluation du crizotinib en néoadjuvant dans les CBNPC de stade IA à IIIA opérable avec un réarrangement ALK ou ROS1 ou une mutation des sites d'épissage de l'exon 14 de MET	NCT03088930	non ouvert	Taux de réponse
Crizotinib	PF 02341066	Pfizer	ALK/ MET/ ROS1	II	Tumeurs solides réfractaires porteurs d'une mutation des sites d'épissage de l'exon 14 de MET	NCT02465060 (subprotocoll C2)	en cours	Taux de réponse
Merestinib	LY2801653	Lilly	MET/TRK1/2/3/MS T1R/FLT3/Axl/INERTK/TEV/ROS1/DDRL/2/MKNK1/2.	II	CBNPC avancé porteur d'une mutation des sites d'épissage de l'exon 14 de MET ayant reçu au moins un traitement systémique	NCT02920996	non ouvert	Taux de réponse
Savolitinib	HMPL-504, AZD6094	Hutchison Medpharma Limited	MET	II	Cancer pulmonaire sarcomatoïde avancé porteur d'une mutation des sites d'épissage de l'exon 14 de MET ayant reçu au moins un traitement systémique	NCT02897479	non ouvert	Taux de réponse

Plusieurs cas de patients avec une mutation MET Δ 14, présentant une réponse objective après un traitement par un ITK MET, ont été rapportés (*tableau supplémentaire 1*) [41,42,52,54–56,63,64]. Ces patients étaient tous porteurs d'un cancer du poumon (le plus souvent un adénocarcinome), à l'exception d'un cas de sarcome histiocytique [41]. Les inhibiteurs de MET utilisés étaient le crizotinib, le capmatinib, et le cabozantinib. Les résultats préliminaires d'une étude de phase 1, l'essai PROFILE 1001, qui évalue un traitement par crizotinib chez les patients atteints d'un CBNPC de stade avancé porteur d'une mutation des sites d'épissage de l'exon 14 de MET, ont rapporté 11 réponses partielles sur 28 patients évaluable, soit un taux de réponse de 39% (IC95% 22-59), avec une survie sans progression médiane de 8 mois (IC95% 6,9-10,8) [65].

Bien que l'interprétation de l'ensemble de ces données soit limitée par le petit nombre de patients, et par des biais de sélection, le taux et la durée des réponses tumorales rapportées sont compatibles avec celles obtenues avec les thérapies ciblées dans d'autres modèles d'addiction oncogénique. Il est important de noter que les réponses obtenues sous ITK MET concernaient à la fois des patients fumeurs et non-fumeurs, des patients avec ou sans gain de copie de *MET*, et des patients avec ou sans atteinte de la voie p53. De façon surprenante, un patient atteint d'un CBNPC à la fois porteur d'une mutation des sites d'épissage de l'exon 14 de *MET* et d'une mutation activatrice de *PIK3CA* a présenté une réponse partielle au crizotinib [59]. Cette observation va à l'encontre des données de réponse au crizotinib obtenues *in vitro* avec la lignée NCI-H596 également porteuse d'une mutation MET Δ 14 et d'une mutation *PIK3CA* [56]. Plusieurs essais cliniques, de phase I ou II, évaluant différents ITK MET sont actuellement en cours dans le traitement des cancers mutés MET. Ils évaluent notamment le crizotinib (NCT02034981, NCT00585195, NCT02465060 (subprotocole C2)), le capmatinib (NCT02414139, NCT02750215), le tepotinib (NCT02864992), le merestinib

(NCT02920996), le glesatinib (NCT02544633), le sitravatinib (NCT02219711) et le savolitinib (NCT02897479) (*tableau 1*).

Perspectives

Un nouveau type de mutations en oncologie thoracique

Jusqu'à présent, les mutations des récepteurs tyrosine kinase connues pour induire une addiction oncogénique dans le cancer pulmonaire étaient principalement des mutations activatrices du domaine tyrosine kinase. Les mutations des sites d'épissage de l'exon 14 sont d'un autre ordre. Elles entraînent la perte d'une partie du récepteur MET, ce qui a comme conséquence de supprimer plusieurs sites de régulation négative. Du fait de ce mécanisme inédit, toutes les conséquences fonctionnelles de ces mutations n'ont pas encore été explorées. Il est ainsi difficile de savoir si une stimulation par l'HGF est nécessaire à l'activation du récepteur MET amputé de l'exon 14.

Il est par ailleurs important de noter qu'à la différence des mutations *EGFR* et des réarrangements *ALK*, les mutations perte d'exon 14 de *MET* surviennent régulièrement chez les patients fumeurs, ce qui pourrait avoir un impact important puisque que ce tabagisme est associé à une plus haute charge mutationnelle [42] et une sensibilité moindre aux ITKs . De plus, l'existence de mutations dans d'autres oncogènes pourrait affecter la sensibilité aux ITK des tumeurs mutées MET, comme cela a été constaté avec le crizotinib dans la lignée NCI-H596 porteuse également d'une mutation *PIK3CA*. Les altérations fréquentes de la voie p53 pourraient refléter la forte proportion de fumeurs parmi les patients porteurs d'une mutation des sites d'épissage de l'exon 14 de *MET* et pourraient entraver la réponse aux ITK MET. Cependant des cas de réponses objectives ont été rapportés malgré la présence d'une amplification de *MDM2* ou d'une mutation *TP53* [41,61,63].

La sensibilité des tumeurs porteuses de mutations MET Δ 14 à d'autres traitements que les thérapies ciblées a été très peu étudiée. Sabari *et al.* ont rapporté un faible taux de réponse (6,7%) parmi 15 patients traités par immunothérapie pour un CBNPC [66]. Dans une analyse translationnelle associée à cette étude, on observait un niveau d'expression de PDL1 plutôt élevé (46% de tumeurs avec expression de PDL1 dans plus de 50% des cellules tumorales) mais une charge mutationnelle moins élevée que dans des tumeurs sans mutation MET Δ 14.

La recherche des mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de MET : un défi en pratique clinique

- Comme les mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de *MET* sont présentes chez un nombre restreint de patients, il est nécessaire de mettre en place une stratégie efficace pour identifier ces altérations afin de sélectionner les patients susceptibles de bénéficier des thérapies ciblant MET. Le NGS est une approche attractive dans ce contexte, du fait de sa large implantation dans les laboratoires de biologie moléculaire et de sa capacité à détecter simultanément un grand nombre d'altérations génétiques. Cependant, les régions introniques sont rarement incluses dans les panels ciblés de NGS ainsi que dans les analyses bioinformatiques. Le premier défi est donc d'adapter ces techniques de séquençage pour détecter toutes les mutations capables d'induire une perte de l'exon 14 de *MET*. Une optimisation de l'analyse bioinformatique est également requise pour détecter ces mutations de tailles et de séquences variables comme l'illustre l'étude de Frampton *et al.* dans laquelle les 120 altérations génétiques différentes aboutissant à une perte de l'exon 14 de MET ont été identifiées à l'aide d'une analyse bioinformatique appropriée [41]. La quantité et la qualité de l'ADN ainsi que le nombre limité de cellules tumorales des prélèvements fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE) sont également des paramètres importants pouvant affecter l'efficacité de détection de ces mutations. Une autre approche serait de

détecter la perte de l'exon 14 directement sur l'ARN. Cependant, le séquençage de l'ARN se heurte à des problèmes de coût, de quantité de matériel nécessaire et à une plus délicate utilisation sur les prélèvements fixés que congelés, rendant son utilisation encore peu compatible avec la pratique clinique.

L'émergence prévisible de mécanismes de résistance aux inhibiteurs de MET

Comme dans les CBNPC avec mutation EGFR ou réarrangement ALK, il est anticipé que le traitement des CBNPC avec mutation *MET* par thérapies ciblées sera systématiquement suivi d'une progression tumorale due à l'émergence de mécanismes de résistance. Les mécanismes de résistances aux thérapies ciblées impliquent généralement des mutations du domaine kinase qui restaurent l'affinité pour l'ATP et/ou altèrent l'affinité aux ITK [67]. Il a ainsi été montré dans des modèles pré-cliniques d'addiction oncogénique à MET que les mutations des résidus D1228 et Y1230 du domaine kinase de MET sont responsables d'une résistance aux inhibiteurs de MET [68,69]. Plusieurs cas cliniques de CBNPC MET Δ 14 présentant une résistance au crizotinib avec des mutations touchant ces résidus ont d'ailleurs été récemment publiés [70–74]. D'autres mécanismes de résistance au ITK MET ont également été décrits dans des tumeurs non mutées *MET* présentant une addiction oncogénique à MET [69,75–79]. Il s'agit notamment d'altérations de MYC, de surexpression de ABCB1, de mutations de *KRAS*, d'amplifications de *HER2*, d'activation d'EGFR, ou de fusions de *BRAF*. Il est possible que de telles altérations participent à la résistance aux ITK MET dans les tumeurs présentant une mutation MET Δ 14. La construction de lignées cellulaires porteuses d'une mutation des sites d'épissage de l'exon 14 de MET et devenues résistantes aux ITK MET, ainsi que la constitution de séries de prélèvements tumoraux pré- et post- résistance aux ITK MET, pourraient permettre d'identifier et d'étudier les mécanismes à l'origine de résistance.

Inversement les mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de *MET* pourraient conférer une résistance aux ITK ciblant d'autres récepteurs tyrosine kinase. De façon intéressante un adénocarcinome pulmonaire initialement porteur d'une mutation activatrice de l'EGFR et d'une mutation T790M a présenté au cours de sa prise en charge une mutation $MET\Delta 14$ [51]. Bien que cela ne soit pas décrit dans cette étude, il est raisonnable de suspecter que la mutation induisant un saut de l'exon 14 de *MET* puisse conférer une résistance au ITK EGFR dans les cancers EGFR mutés de la même façon que l'amplification de *MET*, ou la surexpression d'HGF [22,30]. La comparaison de prélèvements tumoraux de patients avec un CBNPC EGFR muté avant et après traitement par ITK EGFR pourrait permettre d'identifier des cas impliquant les mutations $MET\Delta 14$ dans la résistance.

Conclusion

Au total, les données compilées ici suggèrent que les patients atteints de CBNPC avec mutation des sites d'épissage de l'exon 14 de *MET* peuvent tirer bénéfice d'un traitement par inhibiteurs de MET. Bien que l'existence de processus biologiques conduisant à un saut de l'exon 14 de *MET* soit connue depuis plus d'une décennie, ces mutations n'ont été mises en évidence dans un nombre important de tumeurs humaines que depuis 3 ans. L'amélioration des techniques de séquençage et d'analyses bioinformatiques permettra probablement de mettre en évidence l'implication de sauts d'exon dans le développement d'autres pathologies humaines. Ainsi, il a récemment été montré que des mutations germinales induisant un saut de l'exon 14 de *MET* étaient responsables d'une forme autosomique dominante de dysplasie ostéo-fibreuse (DOF) [80]. Il paraît plutôt déroutant de constater que ces mutations germinales n'induisent pas un plus haut risque de pathologies néoplasiques. Une explication pourrait être que les mutations $MET\Delta 14$ nécessiteraient la survenue d'autres altérations génétiques pour

induire un processus cancéreux, comme cela est suggéré par leur fréquente association avec les amplifications de *MDM2*.

De façon plus générale, l'identification d'un type d'altération moléculaire inédit affectant l'épissage ouvre des perspectives nouvelles. Par exemple, l'épissage alternatif du récepteur tyrosine kinase RON, apparenté à MET, a été découvert dans des xénogreffes d'adénocarcinomes pancréatiques dérivés de patients. Cette altération était associée *in vitro* à des capacités oncogéniques [81]. Comme dans le cas des mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de MET, de nouvelles études sont nécessaires pour comprendre les conséquences fonctionnelles et l'implication clinique de telles altérations.

Points forts généraux :

- Les mutations des sites d'épissage de l'exon 14 du récepteur MET sont observées dans 2 à 3% des cancers bronchiques non à petites cellules.
- Il s'agit d'altérations majoritairement introniques, responsables d'un défaut de maturation de l'ARN messager de MET induisant un saut de l'exon 14 du récepteur.
- L'exon 14 de MET code pour un domaine de régulation négative du récepteur ; sa perte entraîne une dérégulation de la signalisation de MET.
- Du fait de leur grande diversité, les mutations de sites d'épissage de MET nécessitent une optimisation des techniques de biologie moléculaire.
- Plusieurs cas de réponse aux inhibiteurs de MET chez des patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules présentant des mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de MET ont été publiés.
- Des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de MET ont déjà été identifiés, consistant en l'acquisition d'une mutation du domaine kinase de MET.

References

- [1] Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:915–25. doi:10.1038/nrm1261.
- [2] Schiering N, Knapp S, Marconi M, Flocco MM, Cui J, Perego R, et al. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the hepatocyte growth factor receptor c-Met and its complex with the microbial alkaloid K-252a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12654–9. doi:10.1073/pnas.1734128100.
- [3] Furlan A, Kherrouche Z, Montagne R, Copin M-C, Tulasne D. Thirty years of research on met receptor to move a biomarker from bench to bedside. *Cancer Res* 2014;74:6737–44. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1932.
- [4] Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L, Comoglio PM. Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene* 1994;9:49–57.
- [5] Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, et al. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 1994;77:261–71.
- [6] Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 1995;376:768–71. doi:10.1038/376768a0.
- [7] Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995;373:699–702. doi:10.1038/373699a0.
- [8] Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, et al. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 1995;373:702–5. doi:10.1038/373702a0.
- [9] Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, Davies AM, Klein R. Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes Dev* 1997;11:3341–50.
- [10] Calvi C, Podowski M, Lopez-Mercado A, Metzger S, Misono K, Malinina A, et al. Hepatocyte growth factor, a determinant of airspace homeostasis in the murine lung. *PLoS Genet* 2013;9:e1003228. doi:10.1371/journal.pgen.1003228.
- [11] Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, Stradal T, Munz B, Werner S, et al. c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol* 2007;177:151–62. doi:10.1083/jcb.200701086.
- [12] Borowiak M, Garratt AN, Wüstefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10608–13. doi:10.1073/pnas.0403412101.
- [13] Huh C-G, Factor VM, Sánchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4477–82. doi:10.1073/pnas.0306068101.
- [14] Olivero M, Rizzo M, Madeddu R, Casadio C, Pennacchietti S, Nicotra MR, et al. Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 1996;74:1862–8.
- [15] Ichimura E, Maeshima A, Nakajima T, Nakamura T. Expression of c-met/HGF receptor in human non-small cell lung carcinomas in vitro and in vivo and its prognostic significance. *Jpn J Cancer Res Gann* 1996;87:1063–9.
- [16] Wislez M, Rabbe N, Marchal J, Milleron B, Crestani B, Mayaud C, et al. Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death. *Cancer Res* 2003;63:1405–12.

- [17] Park S, Choi Y-L, Sung CO, An J, Seo J, Ahn M-J, et al. High MET copy number and MET overexpression: poor outcome in non-small cell lung cancer patients. *Histol Histopathol* 2012;27:197–207.
- [18] Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, Taylor G, Klineberg E, Hudson EA, et al. Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res* 1997;57:5391–8.
- [19] Ferracini R, Di Renzo MF, Scotlandi K, Baldini N, Olivero M, Lollini P, et al. The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. *Oncogene* 1995;10:739–49.
- [20] Tuck AB, Park M, Sterns EE, Boag A, Elliott BE. Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 1996;148:225–32.
- [21] Turke AB, Zejnullahu K, Wu Y-L, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E, et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell* 2010;17:77–88. doi:10.1016/j.ccr.2009.11.022.
- [22] Yano S, Yamada T, Takeuchi S, Tachibana K, Minami Y, Yatabe Y, et al. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2011;6:2011–7. doi:10.1097/JTO.0b013e31823ab0dd.
- [23] Spigel DR, Edelman MJ, O’Byrne K, Paz-Ares L, Mocci S, Phan S, et al. Results From the Phase III Randomized Trial of Onartuzumab Plus Erlotinib Versus Erlotinib in Previously Treated Stage IIIb or IV Non-Small-Cell Lung Cancer: METLung. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2017;35:412–20. doi:10.1200/JCO.2016.69.2160.
- [24] Ponzetto C, Giordano S, Peverali F, Della Valle G, Abate ML, Vaula G, et al. c-met is amplified but not mutated in a cell line with an activated met tyrosine kinase. *Oncogene* 1991;6:553–9.
- [25] Watermann I, Schmitt B, Stellmacher F, Müller J, Gaber R, Kugler C, et al. Improved diagnostics targeting c-MET in non-small cell lung cancer: expression, amplification and activation? *Diagn Pathol* 2015;10:130. doi:10.1186/s13000-015-0362-5.
- [26] Yang Y, Wu N, Shen J, Teixido C, Sun X, Lin Z, et al. MET overexpression and amplification define a distinct molecular subgroup for targeted therapies in gastric cancer. *Gastric Cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Jpn Gastric Cancer Assoc* 2016;19:778–88. doi:10.1007/s10120-015-0545-5.
- [27] Vassal G, Ledele M, Tournigand C, Aparicio T, Ray-Coquard I, Taillandier L, et al. Activity of crizotinib in relapsed MET amplified malignancies: Results of the French AcSé Program. *J Clin Oncol* 2015;33:2595–2595. doi:10.1200/jco.2015.33.15_suppl.2595.
- [28] Bauer TM, Schuler M, Berardi R, Lim W-T, Van Geel R, De Jonge M, et al. MINI01.03: Phase (Ph) I Study of the Safety and Efficacy of the cMET Inhibitor Capmatinib (INC280) in Patients with Advanced cMET+ NSCLC: Topic: Medical Oncology. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2016;11:S257–8. doi:10.1016/j.jtho.2016.09.018.
- [29] Camidge DR, Ou S-HI, Shapiro G, Otterson GA, Villaruz LC, Villalona-Calero MA, et al. Efficacy and safety of crizotinib in patients with advanced c-MET-amplified non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2014;32:5s.
- [30] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316:1039–43. doi:10.1126/science.1141478.
- [31] Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 1997;16:68–73. doi:10.1038/ng0597-68.
- [32] Jeffers M, Schmidt L, Nakaigawa N, Webb CP, Weirich G, Kishida T, et al. Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:11445–50.
- [33] Joffre C, Barrow R, Ménard L, Calleja V, Hart IR, Kermorgant S. A direct role for Met endocytosis in tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 2011;13:827–37. doi:10.1038/ncb2257.

- [34] Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD, et al. c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res* 2003;63:6272–81.
- [35] Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, Tretiakova MS, Nallasura V, Fox EA, et al. Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2005;65:1479–88. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2650.
- [36] Kong-Beltran M, Seshagiri S, Zha J, Zhu W, Bhawe K, Mendoza N, et al. Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer Res* 2006;66:283–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2749.
- [37] Onozato R, Kosaka T, Kuwano H, Sekido Y, Yatabe Y, Mitsudomi T. Activation of MET by gene amplification or by splice mutations deleting the juxtamembrane domain in primary resected lung cancers. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2009;4:5–11. doi:10.1097/JTO.0b013e3181913e0e.
- [38] Seo J-S, Ju YS, Lee W-C, Shin J-Y, Lee JK, Bleazard T, et al. The transcriptional landscape and mutational profile of lung adenocarcinoma. *Genome Res* 2012;22:2109–19. doi:10.1101/gr.145144.112.
- [39] Vieira T, Antoine M, Ruppert A-M, Fallet V, Duruisseaux M, Giroux Leprieur E, et al. Blood vessel invasion is a major feature and a factor of poor prognosis in sarcomatoid carcinoma of the lung. *Lung Cancer Amst Neth* 2014;85:276–81. doi:10.1016/j.lungcan.2014.06.004.
- [40] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014;511:543–50. doi:10.1038/nature13385.
- [41] Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, Chmielecki J, Lu X, Bauer TM, et al. Activation of MET via Diverse Exon 14 Splicing Alterations Occurs in Multiple Tumor Types and Confers Clinical Sensitivity to MET Inhibitors. *Cancer Discov* 2015;5:850–9. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0285.
- [42] Schrock AB, Frampton GM, Suh J, Chalmers ZR, Rosenzweig M, Erlich RL, et al. Characterization of 298 Patients with Lung Cancer Harboring MET Exon 14 Skipping Alterations. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2016;11:1493–502. doi:10.1016/j.jtho.2016.06.004.
- [43] Gandino L, Longati P, Medico E, Prat M, Comoglio PM. Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *J Biol Chem* 1994;269:1815–20.
- [44] Hashigasako A, Machide M, Nakamura T, Matsumoto K, Nakamura T. Bi-directional regulation of Ser-985 phosphorylation of c-met via protein kinase C and protein phosphatase 2A involves c-Met activation and cellular responsiveness to hepatocyte growth factor. *J Biol Chem* 2004;279:26445–52. doi:10.1074/jbc.M314254200.
- [45] Nakayama M, Sakai K, Yamashita A, Nakamura T, Suzuki Y, Matsumoto K. Met/HGF receptor activation is regulated by juxtamembrane Ser985 phosphorylation in hepatocytes. *Cytokine* 2013;62:446–52. doi:10.1016/j.cyto.2013.04.006.
- [46] Peschard P, Fournier TM, Lamorte L, Naujokas MA, Band H, Langdon WY, et al. Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell* 2001;8:995–1004.
- [47] Weidner KM, Sachs M, Riethmacher D, Birchmeier W. Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2597–601.
- [48] Tulasne D, Deheuninck J, Lourenco FC, Lamballe F, Ji Z, Leroy C, et al. Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. *Mol Cell Biol* 2004;24:10328–39. doi:10.1128/MCB.24.23.10328-10339.2004.
- [49] Foveau B, Leroy C, Ancot F, Deheuninck J, Ji Z, Fafeur V, et al. Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ* 2007;14:752–64. doi:10.1038/sj.cdd.4402080.
- [50] Lefebvre J, Muharram G, Leroy C, Kherrouche Z, Montagne R, Ichim G, et al. Caspase-generated fragment of the Met receptor favors apoptosis via the intrinsic pathway independently of its tyrosine kinase activity. *Cell Death Dis* 2013;4:e871. doi:10.1038/cddis.2013.377.

- [51] Lee J, Ou S-HI, Lee JM, Kim HC, Hong M, Kim SY, et al. Gastrointestinal malignancies harbor actionable MET exon 14 deletions. *Oncotarget* 2015;6:28211–22. doi:10.18632/oncotarget.4721.
- [52] Awad MM, Oxnard GR, Jackman DM, Savukoski DO, Hall D, Shivdasani P, et al. MET Exon 14 Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer Are Associated With Advanced Age and Stage-Dependent MET Genomic Amplification and c-Met Overexpression. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2016;34:721–30. doi:10.1200/JCO.2015.63.4600.
- [53] Tong JH, Yeung SF, Chan AWH, Chung LY, Chau SL, Lung RWM, et al. MET Amplification and Exon 14 Splice Site Mutation Define Unique Molecular Subgroups of Non-Small Cell Lung Carcinoma with Poor Prognosis. *Clin Cancer Res* 2016;22:3048–56. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2061.
- [54] Liu X, Jia Y, Stoopler MB, Shen Y, Cheng H, Chen J, et al. Next-Generation Sequencing of Pulmonary Sarcomatoid Carcinoma Reveals High Frequency of Actionable MET Gene Mutations. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2015. doi:10.1200/JCO.2015.62.0674.
- [55] Heist RS, Shim HS, Gingipally S, Mino-Kenudson M, Le L, Gainor JF, et al. MET Exon 14 Skipping in Non-Small Cell Lung Cancer. *The Oncologist* 2016;21:481–6. doi:10.1634/theoncologist.2015-0510.
- [56] Liu S-Y, Gou L-Y, Li A-N, Lou N-N, Gao H-F, Su J, et al. The Unique Characteristics of MET Exon 14 Mutation in Chinese Patients with NSCLC. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2016;11:1503–10. doi:10.1016/j.jtho.2016.05.016.
- [57] Li S, Choi Y-L, Gong Z, Liu X, Lira M, Kan Z, et al. Comprehensive Characterization of Oncogenic Drivers in Asian Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2016;11:2129–40. doi:10.1016/j.jtho.2016.08.142.
- [58] Jenkins RW, Oxnard GR, Elkin S, Sullivan EK, Carter JL, Barbie DA. Response to Crizotinib in a Patient With Lung Adenocarcinoma Harboring a MET Splice Site Mutation. *Clin Lung Cancer* 2015;16:e101-104. doi:10.1016/j.clcc.2015.01.009.
- [59] Jorge SE, Schulman S, Freed JA, VanderLaan PA, Rangachari D, Kobayashi SS, et al. Responses to the multitargeted MET/ALK/ROS1 inhibitor crizotinib and co-occurring mutations in lung adenocarcinomas with MET amplification or MET exon 14 skipping mutation. *Lung Cancer Amst Neth* 2015;90:369–74. doi:10.1016/j.lungcan.2015.10.028.
- [60] Mendenhall MA, Goldman JW. MET-Mutated NSCLC with Major Response to Crizotinib. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2015;10:e33-34. doi:10.1097/JTO.0000000000000491.
- [61] Paik PK, Drilon A, Fan P-D, Yu H, Rekhtman N, Ginsberg MS, et al. Response to MET Inhibitors in Patients with Stage IV Lung Adenocarcinomas Harboring MET Mutations Causing Exon 14 Skipping. *Cancer Discov* 2015;5:842–9. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-1467.
- [62] Waqar SN, Morgensztern D, Sehn J. MET Mutation Associated with Responsiveness to Crizotinib. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2015;10:e29-31. doi:10.1097/JTO.0000000000000478.
- [63] Mahjoubi L, Gazzah A, Besse B, Lacroix L, Soria J-C. A never-smoker lung adenocarcinoma patient with a MET exon 14 mutation (D1028N) and a rapid partial response after crizotinib. *Invest New Drugs* 2016;34:397–8. doi:10.1007/s10637-016-0332-0.
- [64] Shea M, Huberman MS, Costa DB. Lazarus-Type Response to Crizotinib in a Patient with Poor Performance Status and Advanced MET Exon 14 Skipping Mutation-Positive Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2016;11:e81-82. doi:10.1016/j.jtho.2016.01.017.
- [65] Drilon AE, Camidge DR, Ou S-HI, Clark JW, Socinski MA, Weiss J, et al. Efficacy and safety of crizotinib in patients (pts) with advanced MET exon 14-altered non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2016;34.
- [66] Sabari JK, Montecalvo J, Chen R, Dienstag JA, Mrad C, Bergagnini I, et al. PD-L1 expression and response to immunotherapy in patients with MET exon 14-altered non-small cell lung cancers (NSCLC). *J Clin Oncol* 2017;35:8512–8512. doi:10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.8512.

- [67] Camidge DR, Pao W, Sequist LV. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11:473–81. doi:10.1038/nrclinonc.2014.104.
- [68] Tiedt R, Degenkolbe E, Furet P, Appleton BA, Wagner S, Schoepfer J, et al. A drug resistance screen using a selective MET inhibitor reveals a spectrum of mutations that partially overlap with activating mutations found in cancer patients. *Cancer Res* 2011;71:5255–64. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4433.
- [69] Qi J, McTigue MA, Rogers A, Lifshits E, Christensen JG, Jänne PA, et al. Multiple mutations and bypass mechanisms can contribute to development of acquired resistance to MET inhibitors. *Cancer Res* 2011;71:1081–91. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1623.
- [70] Heist RS, Sequist LV, Borger D, Gainor JF, Arellano RS, Le LP, et al. Acquired Resistance to Crizotinib in NSCLC with MET Exon 14 Skipping. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2016;11:1242–5. doi:10.1016/j.jtho.2016.06.013.
- [71] Ou S-HI, Young L, Schrock AB, Johnson A, Klemptner SJ, Zhu VW, et al. Emergence of Preexisting MET Y1230C Mutation as a Resistance Mechanism to Crizotinib in NSCLC with MET Exon 14 Skipping. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2017;12:137–40. doi:10.1016/j.jtho.2016.09.119.
- [72] Dong H-J, Li P, Wu C-L, Zhou X-Y, Lu H-J, Zhou T. Response and acquired resistance to crizotinib in Chinese patients with lung adenocarcinomas harboring MET Exon 14 splicing alternations. *Lung Cancer Amst Neth* 2016;102:118–21. doi:10.1016/j.lungcan.2016.11.006.
- [73] Schrock AB, Lai A, Ali SM, Miller VA, Raez LE. Mutation of MET Y1230 as an Acquired Mechanism of Crizotinib Resistance in NSCLC with MET Exon 14 Skipping. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2017;12:e89–90. doi:10.1016/j.jtho.2017.02.017.
- [74] Lu X, Peled N, Greer J, Wu W, Choi P, Berger AH, et al. MET exon 14 mutation encodes an actionable therapeutic target in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2017. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1944.
- [75] Shen A, Wang L, Huang M, Sun J, Chen Y, Shen Y-Y, et al. c-Myc alterations confer therapeutic response and acquired resistance to c-Met inhibitors in MET-addicted cancers. *Cancer Res* 2015;75:4548–59. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2743.
- [76] Sugano T, Seike M, Noro R, Soeno C, Chiba M, Zou F, et al. Inhibition of ABCB1 Overcomes Cancer Stem Cell-like Properties and Acquired Resistance to MET Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Mol Cancer Ther* 2015;14:2433–40. doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0050.
- [77] Kwak EL, Ahronian LG, Siravegna G, Mussolin B, Godfrey JT, Clark JW, et al. Molecular Heterogeneity and Receptor Coamplification Drive Resistance to Targeted Therapy in MET-Amplified Esophagogastric Cancer. *Cancer Discov* 2015;5:1271–81. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0748.
- [78] Lee NV, Lira ME, Pavlicek A, Ye J, Buckman D, Bagrodia S, et al. A novel SND1-BRAF fusion confers resistance to c-Met inhibitor PF-04217903 in GTL16 cells through [corrected] MAPK activation. *PLoS One* 2012;7:e39653. doi:10.1371/journal.pone.0039653.
- [79] McDermott U, Pusapati RV, Christensen JG, Gray NS, Settleman J. Acquired resistance of non-small cell lung cancer cells to MET kinase inhibition is mediated by a switch to epidermal growth factor receptor dependency. *Cancer Res* 2010;70:1625–34. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3620.
- [80] Gray MJ, Kannu P, Sharma S, Neyt C, Zhang D, Paria N, et al. Mutations Preventing Regulated Exon Skipping in MET Cause Osteofibrous Dysplasia. *Am J Hum Genet* 2015;97:837–47. doi:10.1016/j.ajhg.2015.11.001.
- [81] Chakedis J, French R, Babicky M, Jaquish D, Howard H, Mose E, et al. A novel protein isoform of the RON tyrosine kinase receptor transforms human pancreatic duct epithelial cells. *Oncogene* 2016;35:3249–59. doi:10.1038/onc.2015.384.

Tableau supplémentaire 1 : Caractéristiques des patients présentant une tumeur porteuse d'une mutation des sites d'épissage de l'exon 14 de MET traités par un inhibiteur de MET. Ce tableau résume les données disponibles concernant les cas publiés de patients présentant une tumeur porteuse d'une mutation des sites d'épissage de l'exon 14 de MET traités par un inhibiteur de MET. (M/F- Masculin/Féminin ; NA-Non Applicable ; GCN-Gene Copy number ; ITK-inhibiteur de tyrosine kinase ; IHC-immunohistochimie, FISH-Fluorescence In Situ Hybridization)

Publication	Age (année)	Sexe	Statut tabagique	Histologie	Fortesurexpression de MET	Détails de l'expression de MET	Amplification de MET	Détails de l'amplification de MET	Autres mutations	Nombre de lignes avant le TKI MET	MET ITK	Réponse RECIST	Durée de la réponse
Waqar <i>et al.</i>	71	M	fumeur	adénocarcinome pulmonaire	NA	NA	non	GCN = 2,23, ratio = 0,96		1	crizotinib	réponse partielle	>6 mois, traitement en cours
Mendenhall <i>et al.</i>	76	F	fumeur	carcinome épidermoïde pulmonaire	NA	NA	NA	NA	amplification MDM2	2	crizotinib	réponse partielle	>19 semaines, traitement en cours
Jenkins <i>et al.</i>	86	M	non fumeur	adénocarcinome pulmonaire	oui	IHC2+ phospho-Met	NA	NA		1	crizotinib	réponse partielle	8 semaines
Paik <i>et al.</i>	80	F	non fumeur	adénocarcinome pulmonaire	oui	forte, H score = 300	oui	GCN = 6	amplification MDM2, mutation mTOR, mutation TERT	2	cabozantinib	maladie stable	>5 mois, traitement en cours
Paik <i>et al.</i>	78	M	fumeur	adénocarcinome pulmonaire	oui	forte, H score = 300	non	non		2	crizotinib	progression	NA
Paik <i>et al.</i>	65	M	fumeur	adénocarcinome pulmonaire	NA	NA	non	Taux d'augmentation de MET = 3,8		2	crizotinib	réponse partielle	>4,6 mois, traitement en cours
Paik <i>et al.</i>	90	F	non fumeur	adénocarcinome pulmonaire	oui	H score = 300	non	NA	amplification MDM2, amplification CDK4	2	crizotinib	réponse partielle	>3,1 mois, traitement en cours
Frampton <i>et al.</i>	84	F	non fumeur	sarcome histiocytique	NA	NA	NA	NA	mutation TP53, mutation ZMYM3	0	crizotinib	réponse partielle	8 mois
Frampton <i>et al.</i>	82	F	fumeur	carcinome pulmonaire à grandes cellules	oui	IHC3+, H score = 270	non	GCN = 6 dans un cancer présentant une triploïdie (not FISH)	mutation TP53	0	capmatinib	réponse partielle	>5 mois, traitement en cours
Frampton <i>et al.</i>	66	F	fumeur	carcinome épidermoïde pulmonaire	oui	IHC3+, H score = 300	oui	GCN = 4 par NGS, 13,8 par FISH, ratio = 2,3		3	capmatinib	réponse partielle	13 mois
Liu <i>et al.</i>	74	F	fumeur	carcinome pulmonaire sarcomatoïde	NA	NA	oui	GCN = 9		1	crizotinib	réponse partielle	NA
Mahjoubi <i>et al.</i>	67	F	non fumeur	adénocarcinome pulmonaire	NA	NA	non	NA	amplification MDM2, amplification CDK4	3	crizotinib	réponse partielle	>5 mois, traitement en cours
Awad <i>et al.</i>	64	F	non fumeur	adénocarcinome pulmonaire	oui	H score = 300	oui	ratio = 8		1	crizotinib	réponse partielle	>8 mois, traitement en cours
Shea <i>et al.</i>	74	F	fumeur	adénocarcinome pulmonaire	NA	NA	NA	NA		1	crizotinib	réponse partielle	NA
Heist <i>et al.</i>	73	F	fumeur	carcinome épidermoïde pulmonaire	NA	NA	NA	NA	mutation ROS1, mutation TP53	3	crizotinib	réponse partielle	8 mois
Heist <i>et al.</i>	73	M	fumeur	carcinome épidermoïde pulmonaire	NA	NA	oui	ratio = 2,2		0	crizotinib	réponse partielle	>7 mois, traitement en cours
Jorge <i>et al.</i>	68	F	fumeur	adénocarcinome pulmonaire	NA	NA	NA	NA	mutation PIK3CA, mutation TP53	NA	crizotinib	réponse partielle	7 mois
Schrock <i>et al.</i>	NA	NA	NA	adénocarcinome pulmonaire	NA	NA	oui	NA	amplification CDK4	NA	crizotinib	réponse partielle	24 mois
Schrock <i>et al.</i>	NA	NA	NA	adénocarcinome pulmonaire	NA	NA	non	NA		NA	crizotinib	réponse partielle	7 mois, traitement en cours
Schrock <i>et al.</i>	NA	NA	NA	adénocarcinome pulmonaire	NA	NA	oui	NA	amplification MDM2	NA	crizotinib	réponse complète	7 mois, traitement en cours
Schrock <i>et al.</i>	NA	NA	NA	adénocarcinome pulmonaire	NA	NA	non	NA		NA	crizotinib	stabilité	4 mois, traitement en cours
Schrock <i>et al.</i>	NA	NA	NA	adénocarcinome pulmonaire	NA	NA	oui	NA	amplification MDM2	NA	crizotinib	réponse partielle	10 mois, traitement en cours
Schrock <i>et al.</i>	NA	NA	NA	carcinome épidermoïde pulmonaire	NA	NA	non	NA		NA	crizotinib	réponse partielle	NA
Schrock <i>et al.</i>	NA	NA	NA	adénocarcinome pulmonaire	NA	NA	non	NA		NA	crizotinib	réponse complète	3 mois, traitement en cours
Schrock <i>et al.</i>	NA	F	non fumeur	adénocarcinome pulmonaire	NA	NA	non	NA		NA	crizotinib	non résecable devenu résecable	NA
Schrock <i>et al.</i>	71	M	non fumeur	adénocarcinome pulmonaire	NA	NA	non	NA	Mutation ATM et TP53	0	crizotinib	stabilité	6 mois
Ou <i>et al.</i>	63	F	non fumeur	adénocarcinome pulmonaire	NA	NA	non	NA		0	crizotinib	réponse partielle	13 mois
Dong <i>et al.</i>	60	F	non fumeur	adénocarcinome pulmonaire	NA	NA	NA	NA		2	crizotinib	réponse partielle	4 mois
Lu <i>et al.</i>	63	F	non fumeur	adénocarcinome pulmonaire	NA	NA	oui	GCN = 15	Amplification CDK6, mutation CDK6, mutation SMARCA4	0	crizotinib	réponse partielle	9 mois

DISCUSSION

L'amplification de *MET* est considérée comme l'une des voies de résistance aux ITK EGFR les mieux caractérisées dans les CBNPC EGFR mutés. Pourtant il n'existe actuellement que très peu de données sur les caractéristiques cliniques, et le pronostic des patients présentant une résistance médiée par *MET*. De plus, les conséquences de l'amplification de *MET* sur le phénotype des cellules tumorales n'ont jusqu'à présent pas été étudiées.

Dans ce travail de thèse, une première publication (article 1) a permis de décrire les caractéristiques cliniques et le pronostic d'une cohorte rétrospective de 42 patients présentant un CBNPC EGFR muté avec une amplification ou une forte surexpression de *MET* après la progression sous ITK EGFR. Bien que limitée par son caractère rétrospectif et l'absence de centralisation des analyses moléculaires, cette étude constitue la plus grande cohorte de patients atteints d'un CBNPC EGFR muté avec une amplification de *MET*. De plus, il s'agit de la première série rapportant l'utilisation d'inhibiteurs de *MET* chez ces patients.

Un deuxième travail en cours de publication (article 2) a permis d'analyser les conséquences de l'amplification de *MET* sur plusieurs réponses biologiques impliquées dans l'agressivité tumorale d'une lignée de CBNPC EGFR muté. Cette étude montre que l'amplification de *MET* lors de la résistance aux ITK EGFR induit un phénotype cellulaire agressif caractérisé entre autre par une transition épithélio-mésenchymateuse et une augmentation de la diffusion métastatique.

Enfin un travail de synthèse (article 3) a été réalisé sur les mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de *MET*. En effet, ces altérations, récemment caractérisées dans les CBNPC, constituent un possible biomarqueur prédictif de réponse aux inhibiteurs de *MET*.

La bonne définition de l'amplification de *MET*

A la différence d'une mutation qui est une variable binaire caractérisée par sa simple présence ou absence, éventuellement pondérée par sa fréquence allélique, l'amplification génique pose le problème du seuil retenu pour sa définition. Diverses techniques telles que la CGH, la qPCR, ou la FISH ont été utilisées pour détecter les amplifications de *MET* mais

toutes ont été confrontées à cette difficulté (Bean *et al.* 2007; Michèle Beau-Faller *et al.* 2008; Cappuzzo *et al.* 2009; Schildhaus *et al.* 2015). Actuellement, si la FISH est considérée comme la technique de référence, il n'existe pas de consensus sur son seuil de positivité. Certaines études se fondent sur la mesure du nombre moyen de copies de *MET*, d'autres sur le ratio du nombre de copies de *MET* rapporté au nombre de copies du centromère chromosome 7 (ratio *MET/CEP7*) avec différents seuils proposés pour chacune de ces mesures (nombre moyen de copies de *MET* ≥ 5 (Cappuzzo *et al.* 2009; Casadevall *et al.* 2015), ou ≥ 6 (Schildhaus *et al.* 2015) ; ratio *MET/CEP7* ≥ 1.8 (Camidge *et al.* 2014) ou ≥ 2 (Arcila *et al.* 2011; Noro *et al.* 2015) ou ≥ 2.2 (Kris *et al.* 2014; Watermann *et al.* 2015)). Le principal intérêt du ratio *MET/CEP7* par rapport au simple nombre moyen de copies de *MET* est de séparer les « vraies » amplifications des polysomies. Cette distinction est importante d'un point de vue thérapeutique car les polysomies entraînent une augmentation du nombre de copies de l'ensemble des gènes portés par le chromosome 7. Elles pourraient donc ne pas s'avérer prédictives d'une situation d'addiction oncogénique à *MET*. Ainsi, Noonan *et al.* ont constaté dans une cohorte de 1164 adénocarcinomes bronchiques que seul un ratio *MET/CEP7* ≥ 5 permettait de définir un groupe de patients ne présentant pas d'association avec d'autres drivers oncogéniques, ce qui pourrait être considéré comme un critère pertinent d'addiction oncogénique (Noonan *et al.* 2016). Un autre critère pourrait être le caractère prédictif de la réponse au traitement. Les résultats préliminaires d'une étude de phase 1 chez les patients présentant une amplification de *MET* ont montré une variation du taux de réponse au crizotinib selon le seuil du ratio *MET/CEP7* (ratio *MET/CEP7* ≥ 1.8 and ≤ 2.2 : taux de réponse global (TRG) = 0%, ratio *MET/CEP7* ≥ 2.2 and < 5 : TRG = 20%, et ratio *MET/CEP7* ≥ 5 : TRG = 50%) (Camidge *et al.* 2014). Là encore, le seuil de 5 pour le ratio *MET/CEP7* semble être le plus discriminant.

Néanmoins, il est important de noter qu'un cas de réponse au crizotinib chez un patient présentant un nombre de copies de *MET* à 6.7 et un ratio *MET/CEP7* à 1.2 a été rapporté (Yan Zhang *et al.* 2016). Par ailleurs, le ratio *MET/CEP7* peut être pris en défaut car la région centromérique *CEP7* peut elle-même être amplifiée sous estimant ainsi le rapport (Schildhaus *et al.* 2015; Schuller *et al.* 2015). Dans l'article 1 nous avons retenu la définition proposée par Schildhaus *et al.* qui retient pour la positivité de la FISH un ratio *MET/CEP7* ≥ 2 ou un nombre de copies de *MET* ≥ 6 ou la présence de clusters de *MET* (Schildhaus *et al.* 2015). Cette définition relativement large correspond aux pratiques de l'ensemble des

centres de l'étude. De manière intéressante dans notre étude 2 patients présentaient une réponse à un ITK MET. L'un présentait un ratio *MET/CEP7* à 5.1 et un nombre moyen de copies de *MET* à 12 et l'autre un ratio *MET/CEP7* 1.76 et un nombre moyen de copies de *MET* à 6.85. Les résultats des essais cliniques en cours chez les patients présentant une amplification de *MET* apporteront probablement un éclairage décisif sur la manière de définir l'amplification, ou du moins le groupe de patients présentant une anomalie du nombre de copies de *MET* et une sensibilité à l'inhibition du récepteur. Enfin, l'utilisation croissante du séquençage de nouvelle génération pour évaluer les variations de nombre de copies des gènes pourrait à nouveau modifier les critères utilisés pour définir l'amplification de *MET*, notamment en apportant des informations sur la taille exacte de la zone amplifiée.

Un profil classique de patient EGFR muté ?

Les caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'article 1 étaient semblables à celles habituellement décrites pour les patients atteints d'un CBNPC EGFR muté (Barlesi et al. 2016). En effet, il a été observé dans notre cohorte un âge médian de 65 ans, ainsi qu'une majorité de femmes et de non-fumeurs. En outre, la prévalence des mutations EGFR, avec plus de 90% de délétions de l'exon 19 et de substitutions L858R de l'exon 21, était comparable à celle classiquement observée dans l'ensemble des CBNPC EGFR mutés (Johnson and Jänne 2005; M. Beau-Faller et al. 2014). Dans notre étude, le taux de réponse aux ITK EGFR était de 82%, la survie globale médiane de 36.2 mois IC95%[27.3-66.5] et la survie sans progression sous ITK EGFR médiane de 11.1 mois IC95%[7.6-14.1]. Le pronostic des patients inclus apparaît donc similaire à celui des CBNPC EGFR mutés traités en première ligne par ITK EGFR de première et deuxième génération dans les essais historiques de phase III (Tableau 1 de l'introduction). De plus la médiane de survie post progression sous ITK EGFR de 18.5 mois IC95%[10.6-27.4] dans l'étude, correspond à celles rapportées dans les séries de CBNPC EGFR mutés rebiopsiés à progression sous ITK EGFR (14.3 à 20 mois) (Oxnard et al. 2011; H. A. Yu et al. 2013; J.-M. Sun et al. 2013). Enfin, il n'a pas été observé de différence significative entre les patients présentant une amplification de *MET* et ceux présentant une simple surexpression de *MET* sans amplification que ce soit en termes de caractéristiques cliniques initiales, de survie globale, de survie sans progression sous ITK EGFR, de survie post progression sous ITK EGFR. L'effet pronostic négatif d'une augmentation du nombre de

copies de *MET*, décrit au diagnostic dans les CBNPC (Dimou et al. 2014; B. Guo et al. 2014), ne semble donc pas se retrouver dans les CBNPC EGFR mutés lors de la résistance aux ITK EGFR. Néanmoins, il est possible que le groupe de patients porteurs d'une surexpression de *MET* sans amplification soit lui-même différent du reste des patients EGFR-mutés en progression, et limite ainsi l'interprétation de ces résultats. Par ailleurs, il est mis en évidence dans l'article 2 que les patients présentant une amplification de *MET* ont la particularité de présenter une survie jusqu'à apparition de nouvelles métastases après la progression sous ITK EGFR, significativement plus courte que celle des patients ne présentant pas cette altération. Ceci suggère donc un rôle spécifique dans la diffusion métastatique, joué par l'amplification de *MET*, lors de la résistance aux inhibiteurs d'EGFR.

MET, Métastases et TEM

Dans l'article 2, nous montrons que l'amplification de *MET* permet non seulement d'induire une résistance aux ITK EGFR dans les cellules de CBNPC EGFR mutés, mais qu'elle entraîne également *in vitro* une augmentation de la prolifération, de la croissance sans ancrage, de la formation de sphéroïdes de la résistance à l'anoïkis, et de la migration. Ceci se traduit *in vivo* par une augmentation de la croissance tumorale et de la formation de métastases. Comme expliqué dans l'introduction de ce travail, l'induction par la voie HGF/MET de réponses biologiques comme la prolifération, la croissance sans ancrage, la résistance à l'apoptose, et la migration, constitue un programme de croissance invasive nécessaire au développement embryonnaire (Gentile and Comoglio 2004; Gentile, Trusolino, and Comoglio 2008). Dans les cancers, le détournement de ce programme lié à une dérégulation de la voie HGF/MET engendre un phénotype tumoral plus agressif. Ainsi, dans plusieurs modèles de cellules cancéreuses, il a ainsi été montré que la dérégulation de l'activité de *MET* *via* une sécrétion autocrine d'HGF permet de stimuler l'invasion, la mobilité cellulaire et la résistance à l'anoïkis (Vadnais et al. 2002; Minseon Park et al. 2005; Laser-Azogui et al. 2014; Zeng et al. 2002). *In vivo*, Navab et al. ont observé que la surexpression de *MET* et d'HGF favorise la croissance tumorale de la lignée cellulaire de CBNPC H460 ainsi que la formation de métastases (Navab et al. 2009). Par ailleurs, l'inhibition de *MET* par un shRNA dans la lignée GTL16, dérivée d'un cancer gastrique et présentant une amplification

de *MET*, est responsable d'une inhibition de la prolifération, de la croissance sans ancrage, de l'invasion, de la croissance tumorale et de la formation de métastases (Corso et al. 2008).

Dans les cellules de CBNPC EGFR muté, il a été montré qu'EGFR stabilise et transactive le récepteur MET. Dans ces cellules, MET est donc activé même en l'absence de ligand, ce qui favorise la migration induite par l'EGF et la formation de métastases cérébrales (Breindel et al. 2013). Cependant un effet additionnel, lié à l'amplification de *MET* sur le phénotype de cellules de CBNPC EGFR muté n'avait pas jusqu'à présent été étudié. De plus, dans notre étude, l'augmentation du potentiel métastatique constaté dans notre modèle cellulaire, semble trouver une traduction clinique puisque les patients porteur d'une amplification de *MET* présentent une vitesse de progression métastatique plus élevée que ceux ayant une simple surexpression de MET sans amplification. De manière étonnante relativement peu de données cliniques sont disponibles sur les conséquences de l'amplification de *MET* sur la diffusion métastatique dans les CBNPC. Benedettini *et al.* ont notamment rapporté dans une série de 17 patients une augmentation de l'expression et du nombre de copies de *MET* dans les métastases cérébrales comparées à la tumeur primaire (Benedettini et al. 2010). Une autre étude réalisée chez des patients opérés d'un CBNPC montre que les augmentations de nombre de copies de *MET* sont plus fréquentes dans les métastases ganglionnaires que dans la tumeur primaire (Tran et al. 2016). Ces données suggèrent que l'amplification de *MET* pourrait être un évènement relativement tardif dans la cancérogenèse mais qui favoriserait la diffusion métastatique des cellules tumorales.

Dans l'article 2, nos résultats suggèrent que le phénotype agressif observé dans les cellules amplifiées *MET* peut être expliqué par un phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). En effet, la TEM est un processus biologique qui conjugue, à des degrés variables, la perte des caractéristiques d'une cellule épithéliale comme la polarité apico-basale, la présence de jonctions serrées, ou l'expression de la E-cadhérine, à l'acquisition d'attributs mésenchymateux tels que l'expression de la vimentine, de la N-Cadhérine, ou du facteur de transcription ZEB1 (Kalluri and Weinberg 2009). Ce processus, régulé par plusieurs facteurs de transcription comme SNAIL, SLUG ou ZEB1, favorise l'invasion des cellules cancéreuses et la progression métastatique (De Craene and Berx 2013). L'analyse de l'expression en IHC de la E-cadhérine et de la vimentine a permis de mettre en évidence l'apparition d'une TEM chez certains les patients EGFR mutés, lors de la progression sous ITK EGFR (Sequist et al. 2011). Nous montrons dans nos travaux que

l'amplification de *MET* engendre dans les cellules de CBNPC EGFR muté, une diminution de la E-cadherine au niveau protéique et une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux étudiés que sont la vimentine et ZEB1, à la fois au niveau transcriptionnel et protéique. Ce processus est de plus réversible puisque l'inhibition de l'activité de MET par un ITK permet de restaurer un phénotype épithélial. Ces résultats sont compatibles avec les données de la littérature sur MET et la TEM dans un contexte différent de celui de la résistance aux thérapies ciblées. En effet, il a été montré dans plusieurs lignées cellulaires que l'HGF comme d'autres facteurs de croissance est capable d'induire une TEM *via* l'activation de MET (De Craene and Berx 2013; Ogunwobi and Liu 2011). Par exemple dans la lignée BNL dérivée d'hépatocytes, l'HGF inhibe *via* l'activation d'AKT et de la voie COX-2 l'expression de la E-cadherine et augmente celle de marqueurs mésenchymateux comme la vimentine, SNAIL, SLUG ou la fibronectine (Ogunwobi and Liu 2011). Dans d'autres lignées cancéreuses hépatiques, il a été montré que TEM induite par la voie HGF/MET implique la voie MAPK et le facteur de transcription Egr1 (Grotegut et al. 2006). Dans la lignée H69 de cancers bronchiques à petites cellules (CBPC), il a été rapporté une diminution de la E-cadherine et une augmentation de l'expression de SNAIL en réponse à l'activation de MET l'HGF (Canadas et al. 2013). Ce phénotype était de plus caractérisé par une agressivité tumorale accrue ainsi qu'une résistance à l'étoposide (Canadas et al. 2013). Dans cette même étude, il a été observé une association entre la phosphorylation de MET et des marqueurs mésenchymateux comme vimentine, SPARC et SNAIL sur les prélèvements tumoraux de patients atteints de CBPC. L'expression de ces marqueurs était de plus corrélée à un mauvais pronostic. Dans les CBNPC EGFR mutés, un phénomène de TEM a été mis en évidence sur certains prélèvements tumoraux réalisés à la progression sous ITK EGFR (Sequist et al. 2011; J.-H. Chung et al. 2011; Uramoto et al. 2010). Les mécanismes moléculaires à l'origine de ce processus ne sont pour l'instant pas encore complètement élucidés. Plusieurs mécanismes ont néanmoins été proposés par des études précliniques. Ainsi, il a été mis en évidence dans des modèles cellulaires incluant la lignée HCC827 que la sécrétion autocrine de TGF β 1 et la dérégulation transcriptionnelle de FGFR1 induisait à la fois une résistance aux ITK EGFR et une transition épithélio-mésenchymateuse (Soucheray et al. 2015; Jakobsen et al. 2017). Par ailleurs, un phénomène de TEM a été constaté dans des cellules EGFR muté MET amplifié après un arrêt du traitement par ITK EGFR (La Monica et al. 2013). Un cas de CBNPC EGFR muté présentant une TEM associée à une amplification de

MET a été rapportée (Miyoshi et al. 2015). Ce patient présentait en effet un prélèvement initial positif en IHC pour la E-cadherine et négatif pour la vimentine, alors que le prélèvement post mortem réalisé après progression sous ITK EGFR était positif pour la vimentine et négatif pour la E-cadherine. Néanmoins la proportion de patients présentant une TEM secondaire à une amplification de *MET* lors de la résistance aux ITK EGFR dans les CBNPC EGFR muté demeure jusqu'à présent inconnue. L'étude de l'expression des marqueurs de TEM sur les prélèvements tumoraux des patients de l'article 1 réalisés au diagnostic et après la résistance au ITK EGFR pourrait permettre de préciser l'implication de *MET* dans l'induction d'un phénotype mésenchymateux.

Association des mécanismes de résistance aux ITK EGFR

Onze patients inclus dans l'article 1 présentaient une mutation EGFR T790M en plus de la surexpression ou de l'amplification de *MET* après la progression sous ITK EGFR. La coexistence de la mutation T790M avec l'amplification de *MET* ou la surexpression de *MET* a été rapportée dans plusieurs travaux (Bean et al. 2007; Ji et al. 2013; Gou et al. 2016). Dans notre étude, la survie globale était significativement plus élevée chez les patients avec une mutation T790M. Un meilleur pronostic a également été observé en cas de mutation T790M lors de la résistance à l'ITK EGFR dans plusieurs études mais indépendamment de la présence d'une surexpression ou d'une amplification de *MET* (H. A. Yu et al. 2013; Oxnard et al. 2011; J.-M. Sun et al. 2013). A l'inverse, un effet péjoratif sur le pronostic de l'association d'une mutation T790M et d'une surexpression de *MET* lors de la résistance aux ITK EGFR a été constaté par Gou *et al.* (Gou et al. 2016). Cette différence par rapport à nos résultats peut s'expliquer par les faibles effectifs des cohortes, par des différences de population (proportion de non fumeurs plus faible dans l'étude de Gou *et al.*) et par d'éventuels facteurs confondants tel que l'âge dans notre étude. Par ailleurs, 9 patients présentant une mutation T790M dans l'article 1 ont reçu un ITK EGFR de 3^e génération et 3 réponses partielles sur 7 patients évaluable ont été observées. Ceci pourrait également expliquer le pronostic plus favorable des patients avec une mutation T90M dans l'article 1. De manière intéressante, 5 patients avec une mutation T790M ont reçu un ITK EGFR de troisième génération après la mise en évidence de la surexpression ou de l'amplification de *MET* et deux de ces patients ont présenté une réponse partielle. Ceci suggère une possible efficacité

de ce type de traitement sur les tumeurs présentant une mutation T790M malgré une dérégulation de MET. Cependant ces réponses pourraient également être le reflet d'une hétérogénéité tumorale avec un contingent de clones muté T790M prédominant sur le contingent présentant une dérégulation de MET.

Vers une association ITK EGFR et ITK MET ?

Dix neuf patients ont reçu un inhibiteur de MET dans l'article 1. Dans la majorité des cas, il s'agissait d'un traitement par crizotinib en monothérapie, IKT ciblant MET, ALK et ROS1 et disposant d'une AMM dans les CBNPC métastatiques avec réarrangement de ALK ou de ROS1. L'utilisation du crizotinib en monothérapie dans notre étude s'explique par l'absence de données sur la tolérance d'une association du crizotinib avec un inhibiteur d'EGFR au moment de la prise en charge des patients. Récemment, une étude de phase 1 a montré qu'un traitement associant le crizotinib à l'erlotinib chez des patients atteints d'un CBNPC métastatique était faisable et généralement bien toléré, mais nécessitait une réduction de la dose de l'ITK EGFR en raison d'une interaction du crizotinib avec le CYP3A4 (Ou et al. 2017). Dans notre étude, parmi les 12 patients évaluable et traités par un inhibiteur de MET en monothérapie, une seule réponse tumorale a été observée. Ce faible taux de réponse est en accord avec des données précliniques publiées montrant qu'un simple traitement par inhibiteur de MET est insuffisant pour empêcher la prolifération de cellules cancéreuses EGFR mutées MET amplifiées (Engelman et al. 2007). Ceci renforce le rationnel et l'intérêt des études en cours de phase I/II testant différents inhibiteurs d'EGFR, en association avec un inhibiteur de MET (Tableau 3). Cependant le choix de l'ITK EGFR associé à l'inhibiteur de MET devra probablement tenir compte de l'association possible entre mutation T790M et amplification de *MET* mentionnée précédemment.

Tableau 3 : Liste des essais en cours testant un inhibiteur de MET en association à un inhibiteur d'EGFR dans les CBNPC EGFR mutés.

Inhibiteur de MET/Inhibiteur d'EGFR	Phase	Inclusion	Numéro d'identification
Capmatinib/erlotinib	1/2	CBNPC avancé EGFR muté MET amplifié avec résistance acquise à l'ITK EGFR	NCT02468661
Capmatinib/erlotinib	1/2	CBNPC avancé EGFR muté avec résistance acquise à l'ITK EGFR et dérégulation de MET (IHC2+ ou copie de MET >5)	NCT01610336
Tepotinib/gefitinib	1/2	CBNPC avancé EGFR muté avec résistance acquise à l'ITK EGFR	NCT01982955
Capmatinib/EGF816	1/2	CBNPC avancé EGFR muté progressant sous ITK EGFR ou naïf de tout ITK EGFR mais avec T790M de novo	NCT02335944
Volitinib/osimertinib	1	CBNPC avancé EGFR muté progressant sous ITK EGFR	NCT02143466
Volitinib/gefitinib	1	CBNPC avancé EGFR muté progressant sous ITK EGFR	NCT02374645
LY2875358/erlotinib	2	CBNPC avancé EGFR muté naïf de tout traitement	NCT01897480
Onartuzumab/erlotinib	2	CBNPC avancé EGFR muté naïf de tout traitement	NCT01887886
Cabozantinib/erlotinib	2	CBNPC EGFR muté ayant progressé sous ITK EGFR	NCT01866410

L'observation, rapportée dans l'article 1, d'une réponse sous monothérapie par ITK MET, chez un patient EGFR muté MET amplifié, est toutefois intéressante. En effet, un cas similaire a déjà été rapporté (Yoshimura et al. 2017). De plus, un travail préclinique suggère qu'une cellule peut changer d'addiction, passant d'une addiction à EGFR à une addiction à MET au moment de la survenue de l'amplification de *MET* (Mizuuchi et al. 2016). Dans les travaux de l'article 2, nous n'avons jamais observé d'addiction des cellules GR6 aux inhibiteurs de MET seuls, même s'il existait un effet partiel de l'inhibition de MET sur certaines propriétés biologiques. La survenue d'un tel phénomène semble par ailleurs très rare (une seule réponse sur 12 patients évaluable dans l'article 1), ce qui n'incite pas à proposer une telle stratégie thérapeutique en cas de progression tumorale liée à l'amplification de *MET*, ce d'autant plus que les premiers résultats préliminaires

d'association de TKI MET et EGFR dans ce contexte font état d'un taux de réponse objective de 30% (Wu et al. 2016).

La séquence thérapeutique optimale

La recherche du mécanisme de résistance à l'origine de la progression sous ITK EGFR est généralement réalisée dans le but d'adapter le traitement au mécanisme de résistance. Ainsi, une transformation histologique en cancer bronchique à petites cellules orientera vers une chimiothérapie adaptée et, surtout, la présence d'une mutation T790M conduit à un traitement par osimertinib qui a démontré sa supériorité à la chimiothérapie dans cette indication (Mok et al. 2017). L'impact du mécanisme de résistance sur l'histoire naturelle de la tumeur a pour l'instant été peu étudié. Les principaux travaux concernent la mutation T790M. En effet, Chmielecki *et al.* ont notamment montré que la mutation T790M est responsable d'une diminution du taux de prolifération cellulaire (Chmielecki et al. 2011). Ceci se traduit par un pronostic plus favorable des patients EGFR mutés indépendamment de tout traitement par un ITK EGFR de troisième génération (Oxnard et al. 2011). Dans l'article 2, nous montrons également un effet du mécanisme de résistance sur l'histoire naturelle de la pathologie néoplasique. En effet, l'amplification de *MET* induit dans notre étude une augmentation des capacités de diffusion métastatique des cellules de CBNPC EGFR muté. Ceci se traduit chez les patients progressant sous ITK EGFR avec une amplification de *MET*, par une vitesse d'apparition de nouvelles métastases plus élevée. Le phénotype agressif, induit par l'amplification de *MET*, plaide donc en faveur d'une utilisation précoce des inhibiteurs MET en association avec les ITK EGFR afin de prévenir l'émergence de ce mécanisme de résistance. Néanmoins, l'utilisation d'une association d'ITK MET et EGFR dès la 1ère ligne de traitement pose d'autres questions, comme celle de la tolérance ou celle des mécanismes de résistance induits par cette association. Dans cette optique, nous avons constitué des clones issus des cellules HCC827, devenus résistants à une association d'ITK EGFR et MET, afin de pouvoir étudier ultérieurement, dans le cadre d'un autre projet, leurs mécanismes de résistance.

Les résultats récents de l'étude de phase III FLAURA ayant comparé l'osimertinib au géfitinib ou à l'erlotinib en 1ère ligne des CBNPC EGFR-mutés ont démontré la supériorité de l'osimertinib dans cette indication, en termes de survie sans progression (Ramalingam et al.

2017). Même si l'impact de cette stratégie sur la survie globale reste incertain, ces résultats pourraient modifier la prise en charge actuelle et faire considérer l'osimertinib dès la 1^{ère} ligne de traitement. Toutefois, là encore, l'amplification de MET pourrait représenter un des principaux mécanismes de résistance, puisque des résultats préliminaires ont rapporté la survenue d'une amplification de MET dans 30% des progressions sous osimertinib (Piotrowska et al. 2017). Ainsi, l'étude d'associations entre l'osimertinib et les ITK MET semble particulièrement importante pour éviter la survenue de ce mécanisme de résistance péjoratif. Ce type d'association est actuellement évalué dans le cadre de l'essai TATTON avec le savolitinib (NCT02143466)(Oxnard et al. 2015).

De nouveaux modes de dérégulation de MET dans la résistance aux ITK EGFR ?

Dans l'article 1, dix-sept patients présentaient une forte surexpression de MET sans amplification du gène codant pour ce récepteur. La question de savoir si d'autres altérations génétiques de *MET* peuvent être à l'origine de la surexpression de MET dans les CBNPC EGFR mutés lors de la progression sous ITK EGFR n'est jusqu'à présent pas résolue. Comme expliqué dans l'article 3, les mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de *MET* sont responsables d'une dérégulation du récepteur *via* le blocage de sa dégradation. Ces mutations sont associées à une surexpression de MET en IHC (J. H. Tong et al. 2016). De plus, plusieurs cas de réponses aux inhibiteurs de MET ont été rapportés chez des patients atteints de CBNPC avec des mutations des sites d'épissage de l'exon 14 (Awad et al. 2016; Paik et al. 2015; S.-Y. Liu et al. 2016; Schrock et al. 2016). Par ailleurs, certaines fusions de MET comme *PTPRZ1-MET* sont aussi responsables d'une surexpression et d'une activation du récepteur (H.-M. Chen et al. 2015). Enfin, des mutations du domaine kinase de MET pourraient également être à l'origine de résistances aux ITK EGFR, comme nous l'avons observé chez un patients suivi au CHRU de Lille, ce qui fait actuellement l'objet d'un projet de recherche indépendant. Cependant ces différentes altérations génétiques n'ont pour l'instant pas été recherchées lors de la résistance aux inhibiteurs d'EGFR dans les CBNPC EGFR mutés. Elles pourraient constituer des mécanismes de résistance originaux ainsi que des biomarqueurs prédictifs de l'efficacité des inhibiteurs de MET dans le contexte de la résistance aux inhibiteurs d'EGFR.

Conclusion

En conclusion, ce travail de thèse a permis de décrire les caractéristiques cliniques et le pronostic des patients atteints d'un CBNPC EGFR muté avec une amplification ou une forte surexpression de MET après la progression sous ITK EGFR. En particulier, il a pu être montré que ces patients présentaient un faible taux de réponse aux inhibiteurs de MET en monothérapie. De plus, il a été observé que l'amplification de *MET* lors de la résistance aux ITK EGFR induit un phénotype cellulaire agressif caractérisé notamment par une transition épithélio-mésenchymateuse et une augmentation de la diffusion métastatique. Ces résultats semblent avoir une traduction clinique puisque les patients présentant une amplification de MET après la progression sous ITK EGFR ont une vitesse de progression par apparition de nouvelle métastase plus rapide que ceux présentant une surexpression de MET sans amplification. L'ensemble de ces résultats plaide en faveur de l'utilisation précoce des inhibiteurs de MET en association aux inhibiteurs d'EGFR afin d'éviter l'émergence d'un clone tumoral agressif. La meilleure stratégie d'association de ces inhibiteurs et l'étude des mécanismes de résistance induits par une telle association restent à déterminer.

BIBLIOGRAPHIE

Abella, Jasmine V., Pascal Peschard, Monica A. Naujokas, Tong Lin, Caroline Saucier, Sylvie Urbé, and Morag Park. 2005. "Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor Ubiquitination Suppresses Transformation and Is Required for Hrs Phosphorylation." *Molecular and Cellular Biology* 25 (21):9632–45. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.21.9632-9645.2005>.

Accordi, Benedetta, Serena Pillozzi, Marta Campo Dell'Orto, Giovanni Cazzaniga, Annarosa Arcangeli, Geertruy Te Kronnie, and Giuseppe Basso. 2007. "Hepatocyte Growth Factor Receptor c-MET Is Associated with FAS and When Activated Enhances Drug-Induced Apoptosis in Pediatric B Acute Lymphoblastic Leukemia with TEL-AML1 Translocation." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (40):29384–93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706314200>.

Aebersold, Daniel M., Olfert Landt, Sylvie Berthou, Günther Gruber, Karl T. Beer, Richard H. Greiner, and Yitzhak Zimmer. 2003. "Prevalence and Clinical Impact of Met Y1253D-Activating Point Mutation in Radiotherapy-Treated Squamous Cell Cancer of the Oropharynx." *Oncogene* 22 (52):8519–23. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206968>.

Alberg, Anthony J, Malcolm V Brock, Jean G Ford, Jonathan M Samet, and Simon D Spivack. 2013. "Epidemiology of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines." *Chest* 143 (5 Suppl):e1S–29S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2345>.

An, Xin, Fang Wang, Qiong Shao, Feng-Hua Wang, Zhi-Qiang Wang, Zhi-Qiang Wang, Cui Chen, et al. 2014. "MET Amplification Is Not Rare and Predicts Unfavorable Clinical Outcomes in Patients with Recurrent/Metastatic Gastric Cancer after Chemotherapy." *Cancer* 120 (5):675–82.

Ancot, Frédéric, Catherine Leroy, Ghaffar Muharram, Jonathan Lefebvre, Jérôme Vicogne, Arnaud Lemiere, Zoulika Kherrouche, et al. 2012. "Shedding-Generated Met Receptor Fragments Can Be Routed to Either the Proteasomal or the Lysosomal Degradation Pathway." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 13 (9):1261–72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01384.x>.

Andermarcher, E., M. A. Surani, and E. Gherardi. 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 (3):254–66. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1996\)18:3<254::AID-DVG6>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:3<254::AID-DVG6>3.0.CO;2-8).

Arcila, Maria E., Geoffrey R. Oxnard, Khedoudja Nafa, Gregory J. Riely, Stephen B. Solomon, Maureen F. Zakowski, Mark G. Kris, William Pao, Vincent A. Miller, and Marc Ladanyi. 2011. "Rebiopsy of Lung Cancer Patients with Acquired Resistance to EGFR Inhibitors and Enhanced Detection of the T790M Mutation Using a Locked Nucleic Acid-Based Assay." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17 (5):1169–80. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2277>.

Artigiani, Stefania, Paolo Conrotto, Pietro Fazzari, Giorgio F. Gilestro, Davide Barberis, Silvia Giordano, Paolo M. Comoglio, and Luca Tamagnone. 2004. "Plexin-B3 Is a

Functional Receptor for Semaphorin 5A." *EMBO Reports* 5 (7):710–14. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400189>.

Awad, Mark M., Geoffrey R. Oxnard, David M. Jackman, Daniel O. Savukoski, Dimity Hall, Priyanka Shivdasani, Jennifer C. Heng, et al. 2016. "MET Exon 14 Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer Are Associated With Advanced Age and Stage-Dependent MET Genomic Amplification and c-Met Overexpression." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 34 (7):721–30. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.4600>.

Awasthi, V., and R. J. King. 2000. "PKC, p42/p44 MAPK, and p38 MAPK Are Required for HGF-Induced Proliferation of H441 Cells." *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 279 (5):L942–949.

Bao, Zhao-Shi, Hui-Min Chen, Ming-Yu Yang, Chuan-Bao Zhang, Kai Yu, Wan-Lu Ye, Bo-Qiang Hu, et al. 2014. "RNA-Seq of 272 Gliomas Revealed a Novel, Recurrent PTPRZ1-MET Fusion Transcript in Secondary Glioblastomas." *Genome Research* 24 (11):1765–73. <https://doi.org/10.1101/gr.165126.113>.

Bardelli, A., P. Longati, D. Gramaglia, M. C. Stella, and P. M. Comoglio. 1997. "Gab1 Coupling to the HGF/Met Receptor Multifunctional Docking Site Requires Binding of Grb2 and Correlates with the Transforming Potential." *Oncogene* 15 (25):3103–11. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201561>.

Bardelli, A., F. Maina, I. Gout, M. J. Fry, M. D. Waterfield, P. M. Comoglio, and C. Ponzetto. 1992. "Autophosphorylation Promotes Complex Formation of Recombinant Hepatocyte Growth Factor Receptor with Cytoplasmic Effectors Containing SH2 Domains." *Oncogene* 7 (10):1973–78.

Barlesi, Fabrice, Julien Mazieres, Jean-Philippe Merlio, Didier Debieuvre, Jean Mosser, Hervé Lena, L'Houcine Ouafik, et al. 2016. "Routine Molecular Profiling of Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Results of a 1-Year Nationwide Programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT)." *Lancet (London, England)* 387 (10026):1415–26. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00004-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00004-0).

Barrow-McGee, Rachel, Naoki Kishi, Carine Joffre, Ludovic Ménard, Alexia Hervieu, Bakhouché A. Bakhouché, Alejandro J. Noval, et al. 2016. "Beta 1-Integrin-c-Met Cooperation Reveals an inside-in Survival Signalling on Autophagy-Related Endomembranes." *Nature Communications* 7 (June):11942. <https://doi.org/10.1038/ncomms11942>.

Basilico, Cristina, Addolorata Arnesano, Maria Galluzzo, Paolo M. Comoglio, and Paolo Michieli. 2008. "A High Affinity Hepatocyte Growth Factor-Binding Site in the Immunoglobulin-like Region of Met." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (30):21267–77. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800727200>.

Bauer, Todd W., Ray J. Somcio, Fan Fan, Wenbiao Liu, Marjorie Johnson, Donald P. Lesslie, Douglas B. Evans, Gary E. Gallick, and Lee M. Ellis. 2006. "Regulatory Role of c-Met in Insulin-like Growth Factor-I Receptor-Mediated Migration and Invasion of Human Pancreatic Carcinoma Cells." *Molecular Cancer Therapeutics* 5 (7):1676–82. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0175>.

Bean, James, Cameron Brennan, Jin-Yuan Shih, Gregory Riely, Agnes Viale, Lu Wang, Dhananjay Chitale, 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 (52):20932–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710370104>.

Beau-Faller, M., N. Prim, A.-M. Ruppert, I. Nanni-Met  llus, R. Lacave, L. Lacroix, F. Escande, et al. 2014. "Rare EGFR Exon 18 and Exon 20 Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer on 10 117 Patients: A Multicentre Observational Study by the French ERMETIC-IFCT Network." *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 25 (1):126–31. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt418>.

Beau-Faller, Michèle, Anne-Marie Ruppert, Anne-Claire Voegeli, Agn  s Neuville, Nicolas Meyer, Eric Guerin, Michèle Legrain, et al. 2008. "MET Gene Copy Number in Non-Small Cell Lung Cancer: Molecular Analysis in a Targeted Tyrosine Kinase Inhibitor Naïve Cohort." *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 3 (4):331–39. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318168d9d4>.

Benedettini, Elisa, Lynette M. Sholl, Michael Peyton, John Reilly, Christopher Ware, Lenora Davis, Natalie Vena, et al. 2010. "Met Activation in Non-Small Cell Lung Cancer Is Associated with de Novo Resistance to EGFR Inhibitors and the Development of Brain Metastasis." *The American Journal of Pathology* 177 (1):415–23. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090863>.

Bertotti, Andrea, Paolo M. Comoglio, and Livio Trusolino. 2005. "Beta4 Integrin Is a Transforming Molecule That Unleashes Met Tyrosine Kinase Tumorigenesis." *Cancer Research* 65 (23):10674–79. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2827>.

Bladt, F., D. Riethmacher, S. Isenmann, A. Aguzzi, and C. Birchmeier. 1995. "Essential Role for the c-Met Receptor in the Migration of Myogenic Precursor Cells into the Limb Bud." *Nature* 376 (6543):768–71. <https://doi.org/10.1038/376768a0>.

Blume-Jensen, P., and T. Hunter. 2001. "Oncogenic Kinase Signalling." *Nature* 411 (6835):355–65. <https://doi.org/10.1038/35077225>.

Boland, Jennifer M., Jin Sung Jang, Jun Li, Adam M. Lee, Jason A. Wampfler, Michele R. Erickson-Johnson, Ibere Soares, et al. 2013. "MET and EGFR Mutations Identified in ALK-Rearranged Pulmonary Adenocarcinoma: Molecular Analysis of 25 ALK-Positive Cases." *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 8 (5):574–81. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318287c395>.

Bonine-Summers, Alyssa R., Mary E. Aakre, Kimberly A. Brown, Carlos L. Arteaga, Jennifer A. Pietenpol, Harold L. Moses, and Nikki Cheng. 2007. "Epidermal Growth Factor Receptor Plays a Significant Role in Hepatocyte Growth Factor Mediated Biological Responses in Mammary Epithelial Cells." *Cancer Biology & Therapy* 6 (4):561–70.

Bottaro, D. P., J. S. Rubin, D. L. Faletto, A. M. Chan, T. E. Kmiecik, G. F. Vande Woude, and S. A. Aaronson. 1991. "Identification of the Hepatocyte Growth Factor Receptor as the c-Met Proto-Oncogene Product." *Science (New York, N.Y.)* 251 (4995):802–4.

Breindel, Jerrica L., Jonathan W. Haskins, Elizabeth P. Cowell, Minghui Zhao, Don X. Nguyen, and David F. Stern. 2013. "EGF Receptor Activates MET through MAPK to Enhance Non-Small Cell Lung Carcinoma Invasion and Brain Metastasis." *Cancer Research* 73 (16):5053–65. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3775>.

Brinkmann, V., H. Foroutan, M. Sachs, K. M. Weidner, and W. Birchmeier. 1995. "Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Induces a Variety of Tissue-Specific

Morphogenic Programs in Epithelial Cells." *The Journal of Cell Biology* 131 (6 Pt 1):1573–86.

Brummer, Tilman, Carsten Schmitz-Peiffer, and Roger J. Daly. 2010. "Docking Proteins." *The FEBS Journal* 277 (21):4356–69. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07865.x>.

Burel-Vandenbos, F., M. Ngo-Mai, B. Dadone, I. Di Mauro, S. Gimet, E. Saada-Bouزيد, V. Bourg, et al. 2017. "MET Immunolabelling Is a Useful Predictive Tool for MET Gene Amplification in Glioblastoma." *Neuropathology and Applied Neurobiology* 43 (3):252–66. <https://doi.org/10.1111/nan.12320>.

Bussolino, F., M. F. Di Renzo, M. Ziche, E. Bocchietto, M. Olivero, L. Naldini, G. Gaudino, L. Tamagnone, A. Coffe, and P. M. Comoglio. 1992. "Hepatocyte Growth Factor Is a Potent Angiogenic Factor Which Stimulates Endothelial Cell Motility and Growth." *The Journal of Cell Biology* 119 (3):629–41.

Calvi, Carla, Megan Podowski, Armando Lopez-Mercado, Shana Metzger, Kaori Misono, Alla Malinina, Dustin Dikeman, et al. 2013. "Hepatocyte Growth Factor, a Determinant of Airspace Homeostasis in the Murine Lung." *PLoS Genetics* 9 (2):e1003228. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003228>.

Camidge, D. Ross, Sai-Hong Ignatius Ou, Geoffrey Shapiro, Gregory Alan Otterson, Liza Cosca Villaruz, Miguel Angel Villalona-Calero, A. John Iafrate, et al. 2014. "Efficacy and Safety of Crizotinib in Patients with Advanced c-MET-Amplified Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)." *Journal of Clinical Oncology* 32:5s (suppl; abstr 8001). <http://meetinglibrary.asco.org/content/132030-144>.

Campbell, Daniel B., Chun Li, James S. Sutcliffe, Antonio M. Persico, and Pat Levitt. 2008. "Genetic Evidence Implicating Multiple Genes in the MET Receptor Tyrosine Kinase Pathway in Autism Spectrum Disorder." *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research* 1 (3):159–68. <https://doi.org/10.1002/aur.27>.

Canadas, Israel, Federico Rojo, Alvaro Taus, Oriol Arpi, Montserrat Arumi-Uria, Lara Pijuan, Silvia Menendez, et al. 2013. "Targeting Epithelial to Mesenchymal Transition with Met Inhibitors Reverts Chemoresistance in Small Cell Lung Cancer." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, November. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1330>.

Cancer Genome Atlas Research Network. 2014. "Comprehensive Molecular Profiling of Lung Adenocarcinoma." *Nature* 511 (7511):543–50. <https://doi.org/10.1038/nature13385>.

Cappuzzo, Federico, Antonio Marchetti, Margaret Skokan, Elisa Rossi, Sujatha Gajapathy, Lara Felicioni, Maela Del Grammasro, et al. 2009. "Increased MET Gene Copy Number Negatively Affects Survival of Surgically Resected Non-Small-Cell Lung Cancer Patients." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (10):1667–74. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.1635>.

Casadevall, David, Javier Gimeno, Sergi Clavé, Álvaro Taus, Lara Pijuan, Miriam Arumí, Marta Lorenzo, et al. 2015. "MET Expression and Copy Number Heterogeneity in Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer (nsNSCLC)." *Oncotarget* 6 (18):16215–26. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3976>.

Catenacci, Daniel V. T., Agnes Ang, Wei-Li Liao, Jing Shen, Emily O'Day, Robert D. Loberg, Fabiola Cecchi, Todd Hembrough, Annamaria Ruzzo, and Francesco Graziano. 2017.

- “MET Tyrosine Kinase Receptor Expression and Amplification as Prognostic Biomarkers of Survival in Gastroesophageal Adenocarcinoma.” *Cancer* 123 (6):1061–70. <https://doi.org/10.1002/cncr.30437>.
- Chan, Po-Chao, Shu-Yi Chen, Chun-Hwa Chen, and Hong-Chen Chen. 2006. “Crosstalk between Hepatocyte Growth Factor and Integrin Signaling Pathways.” *Journal of Biomedical Science* 13 (2):215–23. <https://doi.org/10.1007/s11373-005-9061-7>.
- Chan, Po-Chao, Yen-Ling Chen, Chi-Hung Cheng, Kuo-Ching Yu, Leslie A. Cary, Kuo-Hsiung Shu, William L. Ho, and Hong-Chen Chen. 2003. “Src Phosphorylates Grb2-Associated Binder 1 upon Hepatocyte Growth Factor Stimulation.” *The Journal of Biological Chemistry* 278 (45):44075–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305745200>.
- Chau, G.-Y., W.-Y. Lui, C.-W. Chi, Y.-P. Chau, A.-F. Li, H.-L. Kao, and C.-W. Wu. 2008. “Significance of Serum Hepatocyte Growth Factor Levels in Patients with Hepatocellular Carcinoma Undergoing Hepatic Resection.” *European Journal of Surgical Oncology: The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 34 (3):333–38. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2006.12.007>.
- Chen, H. C., P. C. Chan, M. J. Tang, C. H. Cheng, and T. J. Chang. 1998. “Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase Stimulated by Hepatocyte Growth Factor Leads to Mitogen-Activated Protein Kinase Activation.” *The Journal of Biological Chemistry* 273 (40):25777–82.
- Chen, Hui-Min, Kai Yu, Xiao-yan Tang, Zhao-shi Bao, Tao Jiang, Xiao-Long Fan, Xiao-Wei Chen, and Xiao-Dong Su. 2015. “Enhanced Expression and Phosphorylation of the MET Oncoprotein by Glioma-Specific PTPRZ1-MET Fusions.” *FEBS Letters* 589 (13):1437–43. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.032>.
- Chen, T.-H., P.-C. Chan, C.-L. Chen, and H.-C. Chen. 2011. “Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase on Tyrosine 194 by Met Leads to Its Activation through Relief of Autoinhibition.” *Oncogene* 30 (2):153–66. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.398>.
- Chmielecki, Juliann, Jasmine Foo, Geoffrey R Oxnard, Katherine Hutchinson, Kadoaki Ohashi, Romel Somwar, Lu Wang, et al. 2011. “Optimization of Dosing for EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer with Evolutionary Cancer Modeling.” *Science Translational Medicine* 3 (90):90ra59. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002356>.
- Chmielowiec, Jolanta, Malgorzata Borowiak, Markus Morkel, Theresia Stradal, Barbara Munz, Sabine Werner, Jürgen Wehland, Carmen Birchmeier, and Walter Birchmeier. 2007. “C-Met Is Essential for Wound Healing in the Skin.” *The Journal of Cell Biology* 177 (1):151–62. <https://doi.org/10.1083/jcb.200701086>.
- Chong, Curtis R., and Pasi A. Jänne. 2013. “The Quest to Overcome Resistance to EGFR-Targeted Therapies in Cancer.” *Nature Medicine* 19 (11):1389–1400. <https://doi.org/10.1038/nm.3388>.
- Choueiri, Toni K., Ulka Vaishampayan, Jonathan E. Rosenberg, Theodore F. Logan, Andrea L. Harzstark, Ronald M. Bukowski, Brian I. Rini, et al. 2013. “Phase II and Biomarker Study of the Dual MET/VEGFR2 Inhibitor Foretinib in Patients with Papillary Renal Cell Carcinoma.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (2):181–86. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.3383>.
- Chung, Jin-Haeng, Jin Kyung Rho, Xianhua Xu, Jong Seok Lee, Ho Il Yoon, Choon Taek Lee, Yun Jung Choi, Hye-Ryoun Kim, Cheol Hyeon Kim, and Jae Cheol Lee. 2011. “Clinical and Molecular Evidences of Epithelial to Mesenchymal Transition in Acquired Resistance to

EGFR-TKIs." *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 73 (2):176–82. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.11.011>.

Chung, Jun, Sang-Oh Yoon, Elizabeth A. Lipscomb, and Arthur M. Mercurio. 2004. "The Met Receptor and Alpha 6 Beta 4 Integrin Can Function Independently to Promote Carcinoma Invasion." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (31):32287–93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403809200>.

Comoglio, Paolo M., and Livio Trusolino. 2002. "Invasive Growth: From Development to Metastasis." *The Journal of Clinical Investigation* 109 (7):857–62. <https://doi.org/10.1172/JCI15392>.

Conrotto, Paolo, Donatella Valdembri, Simona Corso, Guido Serini, Luca Tamagnone, Paolo Maria Comoglio, Federico Bussolino, and Silvia Giordano. 2005. "Sema4D Induces Angiogenesis through Met Recruitment by Plexin B1." *Blood* 105 (11):4321–29. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2885>.

Cooper, C. S., M. Park, D. G. Blair, M. A. Tainsky, K. Huebner, C. M. Croce, and G. F. Vande Woude. 1984. "Molecular Cloning of a New Transforming Gene from a Chemically Transformed Human Cell Line." *Nature* 311 (5981):29–33.

Cooper, C. S., P. R. Tempest, M. P. Beckman, C. H. Heldin, and P. Brookes. 1986. "Amplification and Overexpression of the Met Gene in Spontaneously Transformed NIH3T3 Mouse Fibroblasts." *The EMBO Journal* 5 (10):2623–28.

Copin, Marie-Christine, Marie Lesaffre, Mélanie Berbon, Louis Doublet, Catherine Leroy, Emmanuelle Tresch, Henri Porte, et al. 2016. "High-MET Status in Non-Small Cell Lung Tumors Correlates with Receptor Phosphorylation but Not with the Serum Level of Soluble Form." *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 101 (November):59–67. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.09.009>.

Corso, S., C. Migliore, E. Ghiso, G. De Rosa, P. M. Comoglio, and S. Giordano. 2008. "Silencing the MET Oncogene Leads to Regression of Experimental Tumors and Metastases." *Oncogene* 27 (5):684–93. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210697>.

Cortot, Alexis B., and Pasi A. Jänne. 2014. "Molecular Mechanisms of Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor-Mutant Lung Adenocarcinomas." *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society* 23 (133):356–66. <https://doi.org/10.1183/09059180.00004614>.

Costa, Carlota, Miguel Angel Molina, Ana Drozdowskyj, Ana Giménez-Capitán, Jordi Bertran-Alamillo, Niki Karachaliou, Radj Gervais, et al. 2014. "The Impact of EGFR T790M Mutations and BIM mRNA Expression on Outcome in Patients with EGFR-Mutant NSCLC Treated with Erlotinib or Chemotherapy in the Randomized Phase III EURTAC Trial." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20 (7):2001–10. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2233>.

Crepaldi, T., A. Gautreau, P. M. Comoglio, D. Louvard, and M. Arpin. 1997. "Ezrin Is an Effector of Hepatocyte Growth Factor-Mediated Migration and Morphogenesis in Epithelial Cells." *The Journal of Cell Biology* 138 (2):423–34.

Cross, Darren A. E., Susan E. Ashton, Serban Ghitiorghiu, Cath Eberlein, Caroline A. Nebhan, Paula J. Spitzler, Jonathon P. Orme, et al. 2014. "AZD9291, an Irreversible EGFR TKI, Overcomes T790M-Mediated Resistance to EGFR Inhibitors in Lung Cancer." *Cancer Discovery* 4 (9):1046–61. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0337>.

- Dai, Chunsun, Moin A. Saleem, Lawrence B. Holzman, Peter Mathieson, and Youhua Liu. 2010. "Hepatocyte Growth Factor Signaling Ameliorates Podocyte Injury and Proteinuria." *Kidney International* 77 (11):962–73. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.40>.
- Damm, Sabine, Petra Koefinger, Martina Stefan, Christian Wels, Gabor Mehes, Erika Richtig, Helmut Kerl, Marcus Otte, and Helmut Schaidler. 2010. "HGF-Promoted Motility in Primary Human Melanocytes Depends on CD44v6 Regulated via NF-Kappa B, Egr-1, and C/EBP-Beta." *The Journal of Investigative Dermatology* 130 (7):1893–1903. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.45>.
- D'Angelo, Sandra P., M. Catherine Pietanza, Melissa L. Johnson, Gregory J. Riely, Vincent A. Miller, Camelia S. Sima, Maureen F. Zakowski, Valerie W. Rusch, Marc Ladanyi, and Mark G. Kris. 2011. "Incidence of EGFR Exon 19 Deletions and L858R in Tumor Specimens from Men and Cigarette Smokers with Lung Adenocarcinomas." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (15):2066–70. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.6181>.
- Davies, Kurtis D., Terry L. Ng, Adriana Estrada-Bernal, Anh T. Le, Peter R. Ennever, D. Ross Camidge, Robert C. Doebele, and Dara L. Aisner. 2017. "Dramatic Response to Crizotinib in a Patient With Lung Cancer Positive for an HLA-DRB1-MET Gene Fusion." *JCO Precision Oncology*, no. 1 (August):1–6. <https://doi.org/10.1200/PO.17.00117>.
- De Craene, Bram, and Geert Berx. 2013. "Regulatory Networks Defining EMT during Cancer Initiation and Progression." *Nature Reviews. Cancer* 13 (2):97–110. <https://doi.org/10.1038/nrc3447>.
- De Pas, Tommaso, Francesca Toffalorio, Michela Manzotti, Caterina Fumagalli, Gianluca Spitaleri, Chiara Catania, Angelo Delmonte, et al. 2011. "Activity of Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Harboring Rare Epidermal Growth Factor Receptor Mutations." *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6 (11):1895–1901. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318227e8c6>.
- Derman, M. P., M. J. Cunha, E. J. Barros, S. K. Nigam, and L. G. Cantley. 1995. "HGF-Mediated Chemotaxis and Tubulogenesis Require Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase." *The American Journal of Physiology* 268 (6 Pt 2):F1211-1217.
- DeSantis, Carol E., Chun Chieh Lin, Angela B. Mariotto, Rebecca L. Siegel, Kevin D. Stein, Joan L. Kramer, Rick Alteri, Anthony S. Robbins, and Ahmedin Jemal. 2014. "Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2014." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 64 (4):252–71. <https://doi.org/10.3322/caac.21235>.
- Di Renzo, M. F., R. P. Narsimhan, M. Olivero, S. Bretti, S. Giordano, E. Medico, P. Gaglia, P. Zara, and P. M. Comoglio. 1991. "Expression of the Met/HGF Receptor in Normal and Neoplastic Human Tissues." *Oncogene* 6 (11):1997–2003.
- Dimou, Anastasios, Lemuel Non, Young Kwang Chae, William J. Tester, and Konstantinos N. Syrigos. 2014. "MET Gene Copy Number Predicts Worse Overall Survival in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC); a Systematic Review and Meta-Analysis." *PLoS One* 9 (9):e107677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107677>.
- Donate, L. E., E. Gherardi, N. Srinivasan, R. Sowdhamini, S. Aparicio, and T. L. Blundell. 1994. "Molecular Evolution and Domain Structure of Plasminogen-Related Growth Factors (HGF/SF and HGF1/MSP)." *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 3 (12):2378–94. <https://doi.org/10.1002/pro.5560031222>.

- Driessens, M. H., H. Hu, C. D. Nobes, A. Self, I. Jordens, C. S. Goodman, and A. Hall. 2001. "Plexin-B Semaphorin Receptors Interact Directly with Active Rac and Regulate the Actin Cytoskeleton by Activating Rho." *Current Biology: CB* 11 (5):339–44.
- Du, Wanlu, Liubov Uslar, Sindhura Sevala, and Khalid Shah. 2014. "Targeting c-Met Receptor Overcomes TRAIL-Resistance in Brain Tumors." *PloS One* 9 (4):e95490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095490>.
- Dulak, A. M., C. T. Gubish, L. P. Stabile, C. Henry, and J. M. Siegfried. 2011. "HGF-Independent Potentiation of EGFR Action by c-Met." *Oncogene* 30 (33):3625–35. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.84>.
- Durinck, Steffen, Eric W. Stawiski, Andrea Pavía-Jiménez, Zora Modrusan, Payal Kapur, Bijay S. Jaiswal, Na Zhang, et al. 2015. "Spectrum of Diverse Genomic Alterations Define Non-Clear Cell Renal Carcinoma Subtypes." *Nature Genetics* 47 (1):13–21. <https://doi.org/10.1038/ng.3146>.
- Eck, Michael J., and Cai-Hong Yun. 2010. "Structural and Mechanistic Underpinnings of the Differential Drug Sensitivity of EGFR Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1804 (3):559–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.010>.
- Eisenhauer, E A, P Therasse, J Bogaerts, L H Schwartz, D Sargent, R Ford, J Dancey, et al. 2009. "New Response Evaluation Criteria in Solid Tumours: Revised RECIST Guideline (Version 1.1)." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 45 (2):228–47. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026>.
- Engelman, Jeffrey A., Kreshnik Zejnullahu, Tetsuya Mitsudomi, Youngchul Song, Courtney Hyland, Joon Oh Park, Neal Lindeman, et al. 2007. "MET Amplification Leads to Gefitinib Resistance in Lung Cancer by Activating ERBB3 Signaling." *Science (New York, N.Y.)* 316 (5827):1039–43. <https://doi.org/10.1126/science.1141478>.
- Ephstein, Yulia, Patrick A. Singleton, Weiguo Chen, Lichun Wang, Ravi Salgia, Prasad Kanteti, Steven M. Dudek, Joe G. N. Garcia, and Jeffrey R. Jacobson. 2013. "Critical Role of S1PR1 and Integrin β 4 in HGF/C-Met-Mediated Increases in Vascular Integrity." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (4):2191–2200. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.404780>.
- Factor, Valentina M., Daekwan Seo, Tsuyoshi Ishikawa, Pal Kaposi-Novak, Jens U. Marquardt, Jesper B. Andersen, Elizabeth A. Conner, and Snorri S. Thorgeirsson. 2010. "Loss of c-Met Disrupts Gene Expression Program Required for G2/M Progression during Liver Regeneration in Mice." *PloS One* 5 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012739>.
- Ferguson, K. M., P. J. Darling, M. J. Mohan, T. L. Macatee, and M. A. Lemmon. 2000. "Extracellular Domains Drive Homo- but Not Hetero-Dimerization of erbB Receptors." *The EMBO Journal* 19 (17):4632–43. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.17.4632>.
- Ferracini, R., M. F. Di Renzo, K. Scotlandi, N. Baldini, M. Olivero, P. Lollini, O. Cremona, M. Campanacci, and P. M. Comoglio. 1995. "The Met/HGF Receptor Is over-Expressed in Human Osteosarcomas and Is Activated by Either a Paracrine or an Autocrine Circuit." *Oncogene* 10 (4):739–49.
- Ferracini, R., P. Longati, L. Naldini, E. Vigna, and P. M. Comoglio. 1991. "Identification of the Major Autophosphorylation Site of the Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase." *The Journal of Biological Chemistry* 266 (29):19558–64.

- Follenzi, A., S. Bakovic, P. Gual, M. C. Stella, P. Longati, and P. M. Comoglio. 2000. "Cross-Talk between the Proto-Oncogenes Met and Ron." *Oncogene* 19 (27):3041–49. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203620>.
- Fournier, T. M., D. Kamikura, K. Teng, and M. Park. 1996. "Branching Tubulogenesis but Not Scatter of Madin-Darby Canine Kidney Cells Requires a Functional Grb2 Binding Site in the Met Receptor Tyrosine Kinase." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (36):22211–17.
- Foveau, B., Frédéric Ancot, Catherine Leroy, Annalisa Petrelli, Karina Reiss, Valérie Vingtdeux, Silvia Giordano, Véronique Fafeur, and David Tulasne. 2009. "Down-Regulation of the Met Receptor Tyrosine Kinase by Presenilin-Dependent Regulated Intramembrane Proteolysis." *Molecular Biology of the Cell* 20 (9):2495–2507. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-09-0969>.
- Foveau, B., C. Leroy, F. Ancot, J. Deheuninck, Z. Ji, V. Fafeur, and D. Tulasne. 2007. "Amplification of Apoptosis through Sequential Caspase Cleavage of the MET Tyrosine Kinase Receptor." *Cell Death and Differentiation* 14 (4):752–64. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402080>.
- Franco, Mélanie, Claudia Muratori, Simona Corso, Enrico Tenaglia, Andrea Bertotti, Lorena Capparuccia, Livio Trusolino, Paolo M. Comoglio, and Luca Tamagnone. 2010. "The Tetraspanin CD151 Is Required for Met-Dependent Signaling and Tumor Cell Growth." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (50):38756–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.145417>.
- Fukuyama, R., Y. Ichijoh, S. Minoshima, N. Kitamura, and N. Shimizu. 1991. "Regional Localization of the Hepatocyte Growth Factor (HGF) Gene to Human Chromosome 7 Band q21.1." *Genomics* 11 (2):410–15.
- Furlan, Alessandro, Chantal Vercamer, Xavier Desbiens, and Albin Pourtier. 2008. "Ets-1 Triggers and Orchestrates the Malignant Phenotype of Mammary Cancer Cells within Their Matrix Environment." *Journal of Cellular Physiology* 215 (3):782–93. <https://doi.org/10.1002/jcp.21360>.
- Gainor, Justin F., Anna M. Varghese, Sai-Hong Ignatius Ou, Sheheryar Kabraji, Mark M. Awad, Ryohei Katayama, Amanda Pawlak, et al. 2013. "ALK Rearrangements Are Mutually Exclusive with Mutations in EGFR or KRAS: An Analysis of 1,683 Patients with Non-Small Cell Lung Cancer." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (15):4273–81. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0318>.
- Gak, E., W. G. Taylor, A. M. Chan, and J. S. Rubin. 1992. "Processing of Hepatocyte Growth Factor to the Heterodimeric Form Is Required for Biological Activity." *FEBS Letters* 311 (1):17–21.
- Gallego, Marta I, Brian Bierie, and Lothar Hennighausen. 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 (52):8498–8508. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207063>.
- Gandino, L., P. Longati, E. Medico, M. Prat, and P. M. Comoglio. 1994. "Phosphorylation of Serine 985 Negatively Regulates the Hepatocyte Growth Factor Receptor Kinase." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (3):1815–20.

- Garcia-Guzman, M., E. Larsen, and K. Vuori. 2000. "The Proto-Oncogene c-Cbl Is a Positive Regulator of Met-Induced MAP Kinase Activation: A Role for the Adaptor Protein Crk." *Oncogene* 19 (35):4058–65. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203750>.
- Gentile, Alessandra, and Paolo M. Comoglio. 2004. "Invasive Growth: A Genetic Program." *The International Journal of Developmental Biology* 48 (5–6):451–56. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041799ag>.
- Gentile, Alessandra, Livio Trusolino, and Paolo M. Comoglio. 2008. "The Met Tyrosine Kinase Receptor in Development and Cancer." *Cancer Metastasis Reviews* 27 (1):85–94. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9107-6>.
- Ghadjar, Pirus, Wieslawa Blank-Liss, Mathew Simcock, Ivan Hegyi, Karl T. Beer, Holger Moch, Daniel M. Aebersold, and Yitzhak Zimmer. 2009. "MET Y1253D-Activating Point Mutation and Development of Distant Metastasis in Advanced Head and Neck Cancers." *Clinical & Experimental Metastasis* 26 (7):809–15. <https://doi.org/10.1007/s10585-009-9280-9>.
- Ghatak, Shibnath, Vincent C. Hascall, Roger R. Markwald, and Suniti Misra. 2010. "Stromal Hyaluronan Interaction with Epithelial CD44 Variants Promotes Prostate Cancer Invasiveness by Augmenting Expression and Function of Hepatocyte Growth Factor and Androgen Receptor." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (26):19821–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.104273>.
- Gherardi, Ermanno, Christopher A. Love, Robert M. Esnouf, and E. Yvonne Jones. 2004. "The Sema Domain." *Current Opinion in Structural Biology* 14 (6):669–78. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.10.010>.
- Gherardi, Ermanno, Sara Sandin, Maxim V. Petoukhov, John Finch, Mark E. Youles, Lars-Göran Ofverstedt, Ricardo N. Miguel, 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 (11):4046–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509040103>.
- Gherardi, Ermanno, Mark E. Youles, Ricardo N. Miguel, Tom L. Blundell, Luisa Iamele, Julian Gough, Abhishek Bandyopadhyay, Guido Hartmann, and P. Jonathan G. Butler. 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 (21):12039–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.2034936100>.
- Ghousoub, R. A., D. A. Dillon, T. D'Aquila, E. B. Rimm, E. R. Fearon, and D. L. Rimm. 1998. "Expression of c-Met Is a Strong Independent Prognostic Factor in Breast Carcinoma." *Cancer* 82 (8):1513–20.
- Giordano, S., C. Ponzetto, M. F. Di Renzo, C. S. Cooper, and P. M. Comoglio. 1989. "Tyrosine Kinase Receptor Indistinguishable from the c-Met Protein." *Nature* 339 (6220):155–56. <https://doi.org/10.1038/339155a0>.
- Giordano, Silvia, Simona Corso, Paolo Conrotto, Stefania Artigiani, Giorgio Gilestro, Davide Barberis, Luca Tamagnone, and Paolo M. Comoglio. 2002. "The Semaphorin 4D Receptor Controls Invasive Growth by Coupling with Met." *Nature Cell Biology* 4 (9):720–24. <https://doi.org/10.1038/ncb843>.
- Gómez-Lechón, M. J., I. Guillén, X. Ponsoda, R. Fabra, R. Trullenque, T. Nakamura, and J. V. Castell. 1996. "Cell Cycle Progression Proteins (Cyclins), Oncogene Expression, and

Signal Transduction during the Proliferative Response of Human Hepatocytes to Hepatocyte Growth Factor." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 23 (5):1012–19. <https://doi.org/10.1002/hep.510230511>.

Gou, Lan-Ying, An-Na Li, Jin-Ji Yang, Xu-Chao Zhang, Jian Su, Hong-Hong Yan, Zhi Xie, et al. 2016. "The Coexistence of MET over-Expression and an EGFR T790M Mutation Is Related to Acquired Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer." *Oncotarget*, May. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9697>.

Graveel, Carrie R, Cheryl A London, and George F Vande Woude. 2005. "A Mouse Model of Activating Met Mutations." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 4 (4):518–20.

Graveel, Carrie R., David Tolbert, and George F. Vande Woude. 2013. "MET: A Critical Player in Tumorigenesis and Therapeutic Target." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009209>.

Graveel, Carrie, Yanli Su, Julie Koeman, Ling-Mei Wang, Lino Tessarollo, Michele Fiscella, Carmen Birchmeier, Pamela Swiatek, Roderick Bronson, and George Vande Woude. 2004a. "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 (49):17198–203. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407651101>.

———. 2004b. "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 (49):17198–203. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407651101>.

Graziani, A., D. Gramaglia, L. C. Cantley, and P. M. Comoglio. 1991. "The Tyrosine-Phosphorylated Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Receptor Associates with Phosphatidylinositol 3-Kinase." *The Journal of Biological Chemistry* 266 (33):22087–90.

Grisendi, S., M. Arpin, and T. Crepaldi. 1998. "Effect of Hepatocyte Growth Factor on Assembly of Zonula Occludens-1 Protein at the Plasma Membrane." *Journal of Cellular Physiology* 176 (3):465–71. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199809\)176:3<465::AID-JCP3>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199809)176:3<465::AID-JCP3>3.0.CO;2-M).

Grotegut, Stefan, Dietrich von Schweinitz, Gerhard Christofori, and François Lehenbre. 2006. "Hepatocyte Growth Factor Induces Cell Scattering through MAPK/Egr-1-Mediated Upregulation of Snail." *The EMBO Journal* 25 (15):3534–45. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601213>.

Gual, P., S. Giordano, T. A. Williams, S. Rocchi, E. Van Obberghen, and P. M. Comoglio. 2000. "Sustained Recruitment of Phospholipase C-Gamma to Gab1 Is Required for HGF-Induced Branching Tubulogenesis." *Oncogene* 19 (12):1509–18. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203514>.

Guernet, Alexis, Sathish Kumar Mungamuri, Dorthe Cartier, Ravi Sachidanandam, Anitha Jayaprakash, Sahil Adriouch, Myriam Vezain, et al. 2016. "CRISPR-Barcoding for Intratumor Genetic Heterogeneity Modeling and Functional Analysis of Oncogenic Driver Mutations." *Molecular Cell* 63 (3):526–38. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.017>.

Guo, Ailan, Judit Villén, Jon Kornhauser, Kimberly A. Lee, Matthew P. Stokes, Klarisa Rikova, Anthony Possemato, 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 (2):692–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707270105>.

Guo, Baoping, Hong Cen, Xiaohong Tan, Wenjian Liu, and Qing Ke. 2014. "Prognostic Value of MET Gene Copy Number and Protein Expression in Patients with Surgically Resected Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis of Published Literatures." *PLoS One* 9 (6):e99399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099399>.

Gupta, Amit, Pierre I. Karakiewicz, Claus G. Roehrborn, Yair Lotan, Alexandre R. Zlotta, and Shahrokh F. Shariat. 2008. "Predictive Value of Plasma Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Levels in Patients with Clinically Localized Prostate Cancer." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 14 (22):7385–90. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5110>.

Hamanoue, M., K. Kawaida, S. Takao, H. Shimazu, S. Noji, K. Matsumoto, and T. Nakamura. 1992. "Rapid and Marked Induction of Hepatocyte Growth Factor during Liver Regeneration after Ischemic or Crush Injury." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 16 (6):1485–92.

Hammond, D. E., S. Urbé, G. F. Vande Woude, and M. J. Clague. 2001. "Down-Regulation of MET, the Receptor for Hepatocyte Growth Factor." *Oncogene* 20 (22):2761–70. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204475>.

Hammond, Dean E., Stephanie Carter, John McCullough, Sylvie Urbé, George Vande Woude, and Michael J. Clague. 2003. "Endosomal Dynamics of Met Determine Signaling Output." *Molecular Biology of the Cell* 14 (4):1346–54. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-09-0578>.

Harris, Raymond C., Eunkyung Chung, and Robert J. Coffey. 2003. "EGF Receptor Ligands." *Experimental Cell Research* 284 (1):2–13.

Hashigasako, Atsuko, Mitsuru Machide, Takahiro Nakamura, Kunio Matsumoto, and Toshikazu Nakamura. 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 (25):26445–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314254200>.

Hay, E. D., and A. Zuk. 1995. "Transformations between Epithelium and Mesenchyme: Normal, Pathological, and Experimentally Induced." *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation* 26 (4):678–90.

Heideman, D. A., P. J. Snijders, E. Bloemena, C. J. Meijer, G. J. Offerhaus, S. G. Meuwissen, W. R. Gerritsen, and M. E. Craanen. 2001. "Absence of Tpr-Met and Expression of c-Met in Human Gastric Mucosa and Carcinoma." *The Journal of Pathology* 194 (4):428–35.

Heldin, C. H. 1995. "Dimerization of Cell Surface Receptors in Signal Transduction." *Cell* 80 (2):213–23.

Higuchi, Toshio, Takuya Orita, Ken Katsuya, Yoshiki Yamasaki, Kiyotaka Akiyama, Huiping Li, Tadashi Yamamoto, Yutaka Saito, and Motonao Nakamura. 2004. "MUC20 Suppresses the Hepatocyte Growth Factor-Induced Grb2-Ras Pathway by Binding to a Multifunctional Docking Site of Met." *Molecular and Cellular Biology* 24 (17):7456–68. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.17.7456-7468.2004>.

Hiscox, S., and W. G. Jiang. 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 (2):406–11. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1002>.

Horm, Teresa M., Benjamin G. Bitler, Derrick M. Broka, Jeanne M. Louderbough, and Joyce A. Schroeder. 2012. “MUC1 Drives c-Met-Dependent Migration and Scattering.” *Molecular Cancer Research: MCR* 10 (12):1544–54. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0296>.

Huang, T. J., J. Y. Wang, S. R. Lin, S. T. Lian, and J. S. Hsieh. 2001. “Overexpression of the c-Met Protooncogene in Human Gastric Carcinoma--Correlation to Clinical Features.” *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 40 (5):638–43.

Hügel, Rainer, Axel Muendlein, Lennart Volbeding, Heinz Drexel, Erika Richtig, Ulrike Wehkamp, Clemes Painsi, Bernhard Lange-Asschenfeldt, Axel Hauschild, and Friederike Egberts. 2016. “Serum Levels of Hepatocyte Growth Factor as a Potential Tumor Marker in Patients with Malignant Melanoma.” *Melanoma Research* 26 (4):354–60. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000269>.

Huh, Chang-Goo, Valentina M. Factor, Aránzazu Sánchez, Koichi Uchida, Elizabeth A. Conner, and Snorri S. Thorgeirsson. 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 (13):4477–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306068101>.

Hwang, Chang-Il, Andres Matoso, David C. Corney, Andrea Flesken-Nikitin, Stefanie Körner, Wei Wang, Carla Boccaccio, et al. 2011. “Wild-Type p53 Controls Cell Motility and Invasion by Dual Regulation of MET Expression.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (34):14240–45. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017536108>.

Ieraci, Alessandro, Paolo E. Forni, and Carola Ponzetto. 2002. “Viable Hypomorphic Signaling Mutant of the Met Receptor Reveals a Role for Hepatocyte Growth Factor in Postnatal Cerebellar Development.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (23):15200–205. <https://doi.org/10.1073/pnas.222362099>.

Igawa, T., K. Matsumoto, S. Kanda, Y. Saito, and T. Nakamura. 1993. “Hepatocyte Growth Factor May Function as a Renotropic Factor for Regeneration in Rats with Acute Renal Injury.” *The American Journal of Physiology* 265 (1 Pt 2):F61–69.

International Cancer Genome Consortium PedBrain Tumor Project. 2016. “Recurrent MET Fusion Genes Represent a Drug Target in Pediatric Glioblastoma.” *Nature Medicine* 22 (11):1314–20. <https://doi.org/10.1038/nm.4204>.

Ishibe, Shuta, Anil Karihaloo, Hong Ma, Junhui Zhang, Arnaud Marlier, Mitchihiro Mitobe, Akashi Togawa, et al. 2009. “Met and the Epidermal Growth Factor Receptor Act Cooperatively to Regulate Final Nephron Number and Maintain Collecting Duct Morphology.” *Development (Cambridge, England)* 136 (2):337–45. <https://doi.org/10.1242/dev.024463>.

Jackman, David, William Pao, Gregory J. Riely, Jeffrey A. Engelman, Mark G. Kris, Pasi A. Jänne, Thomas Lynch, Bruce E. Johnson, and Vincent A. Miller. 2010. “Clinical Definition of Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the*

American Society of Clinical Oncology 28 (2):357–60.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.7049>.

Jakobsen, K. R., C. Demuth, A. T. Madsen, D. Hussmann, J. Vad-Nielsen, A. L. Nielsen, and B. S. Sorensen. 2017. “MET Amplification and Epithelial-to-Mesenchymal Transition Exist as Parallel Resistance Mechanisms in Erlotinib-Resistant, EGFR-Mutated, NSCLC HCC827 Cells.” *Oncogenesis* 6 (4):e307. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.17>.

Jänne, Pasi A., James Chih-Hsin Yang, Dong-Wan Kim, David Planchard, Yuichiro Ohe, Suresh S. Ramalingam, Myung-Ju Ahn, et al. 2015. “AZD9291 in EGFR Inhibitor-Resistant Non-Small-Cell Lung Cancer.” *The New England Journal of Medicine* 372 (18):1689–99. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411817>.

Jeffers, M., L. Schmidt, N. Nakaigawa, C. P. Webb, G. Weirich, T. Kishida, B. Zbar, and G. F. Vande Woude. 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 (21):11445–50.

Ji, Wonjun, Chang-Min Choi, Jin Kyung Rho, Se Jin Jang, Young Soo Park, Sung-Min Chun, Woo Sung Kim, et al. 2013. “Mechanisms of Acquired Resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitor in Korean Patients with Lung Cancer.” *BMC Cancer* 13 (December):606. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-606>.

Jo, M., D. B. Stolz, J. E. Esplen, K. Dorko, G. K. Michalopoulos, and S. C. Strom. 2000. “Cross-Talk between Epidermal Growth Factor Receptor and c-Met Signal Pathways in Transformed Cells.” *The Journal of Biological Chemistry* 275 (12):8806–11.

Joffre, Carine, Rachel Barrow, Ludovic Ménard, Véronique Calleja, Ian R. Hart, and Stéphanie Kermorgant. 2011. “A Direct Role for Met Endocytosis in Tumorigenesis.” *Nature Cell Biology* 13 (7):827–37. <https://doi.org/10.1038/ncb2257>.

Johnson, Bruce E., and Pasi A. Jänne. 2005. “Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer.” *Cancer Research* 65 (17):7525–29. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1257>.

Ju, Lixia, and Caicun Zhou. 2013. “Association of Integrin beta1 and c-MET in Mediating EGFR TKI Gefitinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer.” *Cancer Cell International* 13 (1):15. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-15>.

Juan, C. de, A. Sánchez, T. Nakamura, I. Fabregat, and M. Benito. 1994. “Hepatocyte Growth Factor up-Regulates Met Expression in Rat Fetal Hepatocytes in Primary Culture.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 204 (3):1364–70.

Kalluri, Raghu, and Robert A Weinberg. 2009. “The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition.” *The Journal of Clinical Investigation* 119 (6):1420–28. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.

Kamei, T., T. Matozaki, T. Sakisaka, A. Kodama, S. Yokoyama, Y. F. Peng, K. Nakano, K. Takaishi, and Y. Takai. 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 (48):6776–84. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203114>.

Kaneko, A., N. Hayashi, H. Tsubouchi, Y. Tanaka, T. Ito, Y. Sasaki, H. Fusamoto, Y. Daikuhara, and T. Kamada. 1992. “Intracellular Calcium as a Second Messenger for Human Hepatocyte Growth Factor in Hepatocytes.” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 15 (6):1173–78.

- Karagonlar, Zeynep F., Peyda Korhan, and Neşe Atabey. 2015. "Targeting c-Met in Cancer by MicroRNAs: Potential Therapeutic Applications in Hepatocellular Carcinoma." *Drug Development Research* 76 (7):357–67. <https://doi.org/10.1002/ddr.21274>.
- Kermorgant, Stéphanie, and Peter J. Parker. 2008a. "Receptor Trafficking Controls Weak Signal Delivery: A Strategy Used by c-Met for STAT3 Nuclear Accumulation." *The Journal of Cell Biology* 182 (5):855–63. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806076>.
- . 2008b. "Receptor Trafficking Controls Weak Signal Delivery: A Strategy Used by c-Met for STAT3 Nuclear Accumulation." *The Journal of Cell Biology* 182 (5):855–63. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806076>.
- Kermorgant, Stéphanie, Daniel Zicha, and Peter J. Parker. 2004. "PKC Controls HGF-Dependent c-Met Traffic, Signalling and Cell Migration." *The EMBO Journal* 23 (19):3721–34. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600396>.
- Khoury, Hanane, Monica A. Naujokas, Dongmei Zuo, Veena Sangwan, Melanie M. Frigault, Stephanie Petkiewicz, David L. Dankort, William J. Muller, and Morag Park. 2005. "HGF Converts ErbB2/Neu Epithelial Morphogenesis to Cell Invasion." *Molecular Biology of the Cell* 16 (2):550–61. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-07-0567>.
- Kirchhofer, Daniel, Mark Peek, Michael T. Lipari, Karen Billeci, Bin Fan, and Paul Moran. 2005. "Hepsin Activates pro-Hepatocyte Growth Factor and Is Inhibited by Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor-1B (HAI-1B) and HAI-2." *FEBS Letters* 579 (9):1945–50. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.085>.
- Kirchhofer, Daniel, Xiaoyi Yao, Mark Peek, Charles Eigenbrot, Michael T. Lipari, Karen L. Billeci, Henry R. Maun, et al. 2004. "Structural and Functional Basis of the Serine Protease-like Hepatocyte Growth Factor Beta-Chain in Met Binding and Signaling." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (38):39915–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404795200>.
- Kiss, A., N. J. Wang, J. P. Xie, and S. S. Thorgeirsson. 1997. "Analysis of Transforming Growth Factor (TGF)-Alpha/Epidermal Growth Factor Receptor, Hepatocyte Growth Factor/C-met, TGF-Beta Receptor Type II, and p53 Expression in Human Hepatocellular Carcinomas." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 3 (7):1059–66.
- Klosek, Sebastian K., Koh-ichi Nakashiro, Shingo Hara, Hiroyuki Goda, Hitoshi Hasegawa, and Hiroyuki Hamakawa. 2009. "CD151 Regulates HGF-Stimulated Morphogenesis of Human Breast Cancer Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379 (4):1097–1100. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.023>.
- Klosek, Sebastian Krystian, Koh-Ichi Nakashiro, Shingo Hara, Satoru Shintani, Hitoshi Hasegawa, and Hiroyuki Hamakawa. 2005. "CD151 Forms a Functional Complex with c-Met in Human Salivary Gland Cancer Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336 (2):408–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.106>.
- Koch, Alexandra, Annalisa Mancini, Omar El Bounkari, and Teruko Tamura. 2005. "The SH2-Domain-Containing Inositol 5-Phosphatase (SHIP)-2 Binds to c-Met Directly via Tyrosine Residue 1356 and Involves Hepatocyte Growth Factor (HGF)-Induced Lamellipodium Formation, Cell Scattering and Cell Spreading." *Oncogene* 24 (21):3436–47. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208558>.
- Kochhar, K. S., and A. P. Iyer. 1996. "Hepatocyte Growth Factor Induces Activation of Nck and Phospholipase C-Gamma in Lung Carcinoma Cells." *Cancer Letters* 104 (2):163–69.

- Komada, M., K. Hatsuzawa, S. Shibamoto, F. Ito, K. Nakayama, and N. Kitamura. 1993. "Proteolytic Processing of the Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Receptor by Furin." *FEBS Letters* 328 (1-2):25-29.
- Komada, M., and N. Kitamura. 1994. "Regulatory Role of Major Tyrosine Autophosphorylation Site of Kinase Domain of c-Met Receptor (Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor Receptor)." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (23):16131-36.
- Kondo, Shunsuke, Hidenori Ojima, Hitoshi Tsuda, Jun Hashimoto, Chigusa Morizane, Masafumi Ikeda, Hideki Ueno, et al. 2013. "Clinical Impact of c-Met Expression and Its Gene Amplification in Hepatocellular Carcinoma." *International Journal of Clinical Oncology* 18 (2):207-13. <https://doi.org/10.1007/s10147-011-0361-9>.
- Kris, Mark G., Bruce E. Johnson, Lynne D. Berry, David J. Kwiatkowski, A. John Iafrate, Ignacio I. Wistuba, Marileila Varella-Garcia, et al. 2014. "Using Multiplexed Assays of Oncogenic Drivers in Lung Cancers to Select Targeted Drugs." *JAMA* 311 (19):1998-2006. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3741>.
- Krishnaswamy, Soundararajan, Rajani Kanteti, Jonathan S. Duke-Cohan, Sivakumar Loganathan, Wanqing Liu, Patrick C. Ma, Martin Sattler, et al. 2009. "Ethnic Differences and Functional Analysis of MET Mutations in Lung Cancer." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15 (18):5714-23. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0070>.
- Kwak, Yoonjin, Seong-Ik Kim, Chul-Kee Park, Sun Ha Paek, Soon-Tae Lee, and Sung-Hye Park. 2015. "C-MET Overexpression and Amplification in Gliomas." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (11):14932-38.
- La Monica, Silvia, Cristina Caffarra, Francesca Sacconi, Elena Galvani, Maricla Galetti, Claudia Fumarola, Mara Bonelli, et al. 2013. "Gefitinib Inhibits Invasive Phenotype and Epithelial-Mesenchymal Transition in Drug-Resistant NSCLC Cells with MET Amplification." *PloS One* 8 (10):e78656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078656>.
- Lamorte, Louie, Isabelle Royal, Monica Naujokas, and Morag Park. 2002. "Crk Adapter Proteins Promote an Epithelial-Mesenchymal-like Transition and Are Required for HGF-Mediated Cell Spreading and Breakdown of Epithelial Adherens Junctions." *Molecular Biology of the Cell* 13 (5):1449-61. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-10-0477>.
- Lan, Fengming, Huiming Yu, Man Hu, Tingyi Xia, and Xiao Yue. 2015. "miR-144-3p Exerts Anti-Tumor Effects in Glioblastoma by Targeting c-Met." *Journal of Neurochemistry* 135 (2):274-86. <https://doi.org/10.1111/jnc.13272>.
- Laser-Azogui, A., T. Diamant-Levi, S. Israeli, Y. Roytman, and I. Tsarfaty. 2014. "Met-Induced Membrane Blebbing Leads to Amoeboid Cell Motility and Invasion." *Oncogene* 33 (14):1788-98. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.138>.
- Lee, J. H., S. U. Han, H. Cho, B. Jennings, B. Gerrard, M. Dean, L. Schmidt, B. Zbar, and G. F. Vande Woude. 2000. "A Novel Germ Line Juxtamembrane Met Mutation in Human Gastric Cancer." *Oncogene* 19 (43):4947-53. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203874>.
- Lee, Sheau-Ling, Pao-Yi Huang, Peter Roller, Eun-Gyung Cho, Dongeun Park, and Robert B. Dickson. 2010. "Matriptase/Epithin Participates in Mammary Epithelial Cell Growth and Morphogenesis through HGF Activation." *Mechanisms of Development* 127 (1-2):82-95. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2009.10.004>.

- Lefebvre, J., G. Muharram, C. Leroy, Z. Kherrouche, R. Montagne, G. Ichim, S. Tauszig-Delamasure, 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 (October):e871. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.377>.
- Lemmon, Mark A., and Joseph Schlessinger. 2010. "Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases." *Cell* 141 (7):1117–34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>.
- Lemmon, Mark A., Joseph Schlessinger, and Kathryn M. Ferguson. 2014. "The EGFR Family: Not so Prototypical Receptor Tyrosine Kinases." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (4):a020768. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020768>.
- Li, N., A. Batzer, R. Daly, V. Yajnik, E. Skolnik, P. Chardin, D. Bar-Sagi, B. Margolis, and J. Schlessinger. 1993. "Guanine-Nucleotide-Releasing Factor hSos1 Binds to Grb2 and Links Receptor Tyrosine Kinases to Ras Signalling." *Nature* 363 (6424):85–88. <https://doi.org/10.1038/363085a0>.
- Li, Ning, Marta Lorinczi, Keith Ireton, and Lisa A. Elferink. 2007. "Specific Grb2-Mediated Interactions Regulate Clathrin-Dependent Endocytosis of the cMet-Tyrosine Kinase." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (23):16764–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610835200>.
- Li, Y. Q., S. S. Song, S. H. Jiang, and X. Y. Zhang. 2017. "Combination Therapy of Erlotinib/Crizotinib in a Lung Adenocarcinoma Patient with Primary EGFR Mutation plus Secondary MET Amplification and a Novel Acquired Crizotinib-Resistant Mutation MET G1108C." *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 28 (10):2622–24. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx324>.
- Li, Ying, Xiaohua Huang, Jianing Zhang, Yuzhong Li, and Keli Ma. 2013. "Synergistic Inhibition of Cell Migration by Tetraspanin CD82 and Gangliosides Occurs via the EGFR or cMet-Activated PI3K/Akt Signalling Pathway." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (11):2349–58. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.08.002>.
- Li, Yingqin, Wenfei Li, Qingmei He, Yafei Xu, Xianyue Ren, Xinran Tang, Xin Wen, et al. 2015. "Prognostic Value of MET Protein Overexpression and Gene Amplification in Locoregionally Advanced Nasopharyngeal Carcinoma." *Oncotarget* 6 (15):13309–19. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3751>.
- Lin, J. C., M. Naujokas, H. Zhu, S. Nolet, and M. Park. 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 (7):833–42. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201599>.
- Liu, Si-Yang, Lan-Ying Gou, An-Na Li, Na-Na Lou, Hong-Fei Gao, Jian Su, Jin-Ji Yang, et al. 2016. "The Unique Characteristics of MET Exon 14 Mutation in Chinese Patients with NSCLC." *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 11 (9):1503–10. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.05.016>.
- Liu, Y. 1999. "Hepatocyte Growth Factor Promotes Renal Epithelial Cell Survival by Dual Mechanisms." *The American Journal of Physiology* 277 (4 Pt 2):F624–633.
- Liu, Yingjie, Nibedita Chattopadhyay, Shan Qin, Charles Szekeres, Tetyana Vasylieva, Zhen X. Mahoney, Mary Taglienti, et al. 2009. "Coordinate Integrin and c-Met Signaling

Regulate Wnt Gene Expression during Epithelial Morphogenesis." *Development (Cambridge, England)* 136 (5):843–53. <https://doi.org/10.1242/dev.027805>.

Liu, Zhen-Xiang, Cheng Fang Yu, Christian Nickel, Sheila Thomas, and Lloyd G. Cantley. 2002. "Hepatocyte Growth Factor Induces ERK-Dependent Paxillin Phosphorylation and Regulates Paxillin-Focal Adhesion Kinase Association." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (12):10452–58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107551200>.

Lock, L. S., I. Royal, M. A. Naujokas, and M. Park. 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 (40):31536–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003597200>.

Lock, Lisa S., Melanie M. Frigault, Caroline Saucier, and Morag Park. 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 (32):30083–90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302675200>.

Lokker, N. A., M. R. Mark, E. A. Luis, G. L. Bennett, K. A. Robbins, J. B. Baker, and P. J. Godowski. 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 (7):2503–10.

Longati, P., A. Bardelli, C. Ponzetto, L. Naldini, and P. M. Comoglio. 1994. "Tyrosines1234-1235 Are Critical for Activation of the Tyrosine Kinase Encoded by the MET Proto-Oncogene (HGF Receptor)." *Oncogene* 9 (1):49–57.

Lutterbach, Bart, Qinwen Zeng, Lenora J. Davis, Harold Hatch, Gaozhen Hang, Nancy E. Kohl, Jackson B. Gibbs, and Bo-Sheng Pan. 2007. "Lung Cancer Cell Lines Harboring MET Gene Amplification Are Dependent on Met for Growth and Survival." *Cancer Research* 67 (5):2081–88. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3495>.

Lynch, Thomas J, Daphne W Bell, Raffaella Sordella, Sarada Gurubhagavatula, Ross A Okimoto, Brian W Brannigan, Patricia L Harris, et al. 2004. "Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib." *The New England Journal of Medicine* 350 (21):2129–39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040938>.

Ma, Hong, Maryanna Saenko, Anthony Opuko, Akashi Togawa, Keita Soda, Arnaud Marlier, Gilbert W. Moeckel, Lloyd G. Cantley, and Shuta Ishibe. 2009. "Deletion of the Met Receptor in the Collecting Duct Decreases Renal Repair Following Ureteral Obstruction." *Kidney International* 76 (8):868–76. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.304>.

Ma, Patrick C., Takashi Kijima, Gautam Maulik, Edward A. Fox, Martin Sattler, James D. Griffin, Bruce E. Johnson, and Ravi Salgia. 2003. "C-MET Mutational Analysis in Small Cell Lung Cancer: Novel Juxtamembrane Domain Mutations Regulating Cytoskeletal Functions." *Cancer Research* 63 (19):6272–81.

Ma, Patrick C., Maria S. Tretiakova, Alexander C. MacKinnon, Nithya Ramnath, Candace Johnson, Sascha Dietrich, Tanguy Seiwert, et al. 2008. "Expression and Mutational Analysis of MET in Human Solid Cancers." *Genes, Chromosomes & Cancer* 47 (12):1025–37. <https://doi.org/10.1002/gcc.20604>.

Maemondo, Makoto, Akira Inoue, Kunihiko Kobayashi, Shunichi Sugawara, Satoshi Oizumi, Hiroshi Isobe, Akihiko Gemma, et al. 2010. "Gefitinib or Chemotherapy for Non-

Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR." *The New England Journal of Medicine* 362 (25):2380–88. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0909530>.

Maina, F., F. Casagrande, E. Audero, A. Simeone, P. M. Comoglio, R. Klein, and C. Ponzetto. 1996. "Uncoupling of Grb2 from the Met Receptor in Vivo Reveals Complex Roles in Muscle Development." *Cell* 87 (3):531–42.

Maroun, C. R., M. Holgado-Madruga, I. Royal, M. A. Naujokas, T. M. Fournier, A. J. Wong, and M. Park. 1999. "The Gab1 PH Domain Is Required for Localization of Gab1 at Sites of Cell-Cell Contact and Epithelial Morphogenesis Downstream from the Met Receptor Tyrosine Kinase." *Molecular and Cellular Biology* 19 (3):1784–99.

Maroun, C. R., M. A. Naujokas, M. Holgado-Madruga, A. J. Wong, and M. Park. 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 (22):8513–25.

Marquardt, Jens U., Daekwan Seo, Luis E. Gómez-Quiroz, Koichi Uchida, Matthew C. Gillen, Mitsuteru Kitade, Pal Kaposi-Novak, Elizabeth A. Conner, Valentina M. Factor, and Snorri S. Thorgeirsson. 2012. "Loss of c-Met Accelerates Development of Liver Fibrosis in Response to CCl(4) Exposure through Deregulation of Multiple Molecular Pathways." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1822 (6):942–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.02.012>.

Mars, W. M., R. Zarnegar, and G. K. Michalopoulos. 1993. "Activation of Hepatocyte Growth Factor by the Plasminogen Activators uPA and tPA." *The American Journal of Pathology* 143 (3):949–58.

Matsumoto, K., K. Matsumoto, T. Nakamura, and R. H. Kramer. 1994. "Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Induces Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase (p125FAK) and Promotes Migration and Invasion by Oral Squamous Cell Carcinoma Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (50):31807–13.

Matzke, Alexandra, Vardanush Sargsyan, Bettina Holtmann, Gayane Aramuni, Esther Asan, Michael Sendtner, Giuseppina Pace, 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 (24):8797–8806. <https://doi.org/10.1128/MCB.01355-07>.

McDonnell, Laura M., Kristin D. Kernohan, Kym M. Boycott, and Sarah L. Sawyer. 2015. "Receptor Tyrosine Kinase Mutations in Developmental Syndromes and Cancer: Two Sides of the Same Coin." *Human Molecular Genetics* 24 (R1):R60–66. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv254>.

Mela, Angeliki, and James E. Goldman. 2013. "CD82 Blocks cMet Activation and Overcomes Hepatocyte Growth Factor Effects on Oligodendrocyte Precursor Differentiation." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (18):7952–60. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5836-12.2013>.

Michieli, P., C. Basilico, S. Pennacchietti, A. Maffè, L. Tamagnone, S. Giordano, A. Bardelli, and P. M. Comoglio. 1999. "Mutant Met-Mediated Transformation Is Ligand-Dependent and Can Be Inhibited by HGF Antagonists." *Oncogene* 18 (37):5221–31. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202899>.

Migliore, Cristina, Valentina Martin, Vera P. Leoni, Angelo Restivo, Luigi Atzori, Annalisa Petrelli, Claudio Isella, et al. 2012. "MiR-1 Downregulation Cooperates with MACC1 in Promoting MET Overexpression in Human Colon Cancer." *Clinical Cancer Research: An*

Official Journal of the American Association for Cancer Research 18 (3):737–47. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1699>.

Migliore, Cristina, Annalisa Petrelli, Elena Ghiso, Simona Corso, Lorena Capparuccia, Adriana Eramo, Paolo M. Comoglio, and Silvia Giordano. 2008. “MicroRNAs Impair MET-Mediated Invasive Growth.” *Cancer Research* 68 (24):10128–36. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2148>.

Mitamura, T., H. Watari, L. Wang, H. Kanno, M. K. Hassan, M. Miyazaki, Y. Katoh, et al. 2013. “Downregulation of miRNA-31 Induces Taxane Resistance in Ovarian Cancer Cells through Increase of Receptor Tyrosine Kinase MET.” *Oncogenesis* 2 (March):e40. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.3>.

Mitra, A. K., K. Sawada, P. Tiwari, K. Mui, K. Gwin, and E. Lengyel. 2011. “Ligand-Independent Activation of c-Met by Fibronectin and $\alpha(5)\beta(1)$ -Integrin Regulates Ovarian Cancer Invasion and Metastasis.” *Oncogene* 30 (13):1566–76. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.532>.

Mitsudomi, Tetsuya, Satoshi Morita, Yasushi Yatabe, Shunichi Negoro, Isamu Okamoto, Junji Tsurutani, Takashi Seto, et al. 2010. “Gefitinib versus Cisplatin plus Docetaxel in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor (WJTOG3405): An Open Label, Randomised Phase 3 Trial.” *The Lancet. Oncology* 11 (2):121–28. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70364-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70364-X).

Miyoshi, Seigo, Takahide Kato, Hitoshi Katayama, Ryoji Ito, Yosuke Mizuno, Takafumi Okura, and Jitsuo Higaki. 2015. “A Case of EGFR Mutant Lung Adenocarcinoma That Acquired Resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors with MET Amplification and Epithelial-to-Mesenchymal Transition.” *OncoTargets and Therapy* 8:783–87. <https://doi.org/10.2147/OTT.S78911>.

Mizuuchi, Hiroshi, Kenichi Suda, Isao Murakami, Kazuko Sakai, Katsuaki Sato, Yoshihisa Kobayashi, Masaki Shimoji, et al. 2016. “Oncogene Swap as a Novel Mechanism of Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitor in Lung Cancer.” *Cancer Science* 107 (4):461–68. <https://doi.org/10.1111/cas.12905>.

Mok, Tony S., Yi-Long Wu, Myung-Ju Ahn, Marina C. Garassino, Hye R. Kim, Suresh S. Ramalingam, Frances A. Shepherd, et al. 2017. “Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer.” *The New England Journal of Medicine* 376 (7):629–40. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1612674>.

Mok, Tony S., Yi-Long Wu, Sumitra Thongprasert, Chih-Hsin Yang, Da-Tong Chu, Nagahiro Saijo, Patrapim Sunpaweravong, et al. 2009. “Gefitinib or Carboplatin-Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma.” *The New England Journal of Medicine* 361 (10):947–57. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810699>.

Montagne, R., M. Berbon, L. Doublet, N. Debreuck, A. Baranzelli, H. Drobecq, C. Leroy, et al. 2015. “Necrosis- and Apoptosis-Related Met Cleavages Have Divergent Functional Consequences.” *Cell Death & Disease* 6 (May):e1769. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.132>.

Montesano, R., J. V. Soriano, K. M. Malinda, M. L. Ponce, A. Bafico, H. K. Kleinman, D. P. Bottaro, and S. A. Aaronson. 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 (5):355–65.

- Moumen, Anice, Salvatore Patané, Almudena Porras, Rosanna Dono, and Flavio Maina. 2007. "Met Acts on Mdm2 via mTOR to Signal Cell Survival during Development." *Development (Cambridge, England)* 134 (7):1443–51. <https://doi.org/10.1242/dev.02820>.
- Mueller, Kelly L., Lauren A. Hunter, Stephen P. Ethier, and Julie L. Boerner. 2008. "Met and c-Src Cooperate to Compensate for Loss of Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Activity in Breast Cancer Cells." *Cancer Research* 68 (9):3314–22. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0132>.
- Muharram, Ghaffar, Pranshu Sahgal, Taina Korpela, Nicola De Franceschi, Riina Kaukonen, Katherine Clark, David Tulasne, Olli Carpén, and Johanna Ivaska. 2014. "Tensin-4-Dependent MET Stabilization Is Essential for Survival and Proliferation in Carcinoma Cells." *Developmental Cell* 29 (4):421–36. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.03.024>.
- Müller, Markus, Alessandro Morotti, and Carola Ponzetto. 2002. "Activation of NF-kappaB Is Essential for Hepatocyte Growth Factor-Mediated Proliferation and Tubulogenesis." *Molecular and Cellular Biology* 22 (4):1060–72.
- Naka, D., T. Ishii, Y. Yoshiyama, K. Miyazawa, H. Hara, T. Hishida, and N. Kidamura. 1992. "Activation of Hepatocyte Growth Factor by Proteolytic Conversion of a Single Chain Form to a Heterodimer." *The Journal of Biological Chemistry* 267 (28):20114–19.
- Naka, D., T. Shimomura, Y. Yoshiyama, M. Sato, M. Sato, T. Ishii, and H. Hara. 1993. "Internalization and Degradation of Hepatocyte Growth Factor in Hepatocytes with down-Regulation of the Receptor/C-Met." *FEBS Letters* 329 (1–2):147–52.
- Nakamura, T., K. Nawa, and A. Ichihara. 1984. "Partial Purification and Characterization of Hepatocyte Growth Factor from Serum of Hepatectomized Rats." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 122 (3):1450–59.
- Nakamura, T., K. Nawa, A. Ichihara, N. Kaise, and T. Nishino. 1987. "Purification and Subunit Structure of Hepatocyte Growth Factor from Rat Platelets." *FEBS Letters* 224 (2):311–16.
- Nakamura, Yu, Toshiro Niki, Akiteru Goto, Teppei Morikawa, Keiji Miyazawa, Jun Nakajima, and Masashi Fukayama. 2007. "C-Met Activation in Lung Adenocarcinoma Tissues: An Immunohistochemical Analysis." *Cancer Science* 98 (7):1006–13. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00493.x>.
- Nakayama, Mizuho, Katsuya Sakai, Atsuko Yamashita, Takahiro Nakamura, Yoshinori Suzuki, and Kunio Matsumoto. 2013. "Met/HGF Receptor Activation Is Regulated by Juxtamembrane Ser985 Phosphorylation in Hepatocytes." *Cytokine* 62 (3):446–52. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.04.006>.
- Naldini, L., L. Tamagnone, E. Vigna, M. Sachs, G. Hartmann, W. Birchmeier, Y. Daikuhara, H. Tsubouchi, F. Blasi, and P. M. Comoglio. 1992. "Extracellular Proteolytic Cleavage by Urokinase Is Required for Activation of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor." *The EMBO Journal* 11 (13):4825–33.
- Naldini, L., E. Vigna, R. P. Narsimhan, G. Gaudino, R. Zarnegar, G. K. Michalopoulos, and P. M. Comoglio. 1991. "Hepatocyte Growth Factor (HGF) Stimulates the Tyrosine Kinase Activity of the Receptor Encoded by the Proto-Oncogene c-MET." *Oncogene* 6 (4):501–4.

- Naldini, L., K. M. Weidner, E. Vigna, G. Gaudino, A. Bardelli, C. Ponzetto, R. P. Narsimhan, G. Hartmann, R. Zarnegar, and G. K. Michalopoulos. 1991. "Scatter Factor and Hepatocyte Growth Factor Are Indistinguishable Ligands for the MET Receptor." *The EMBO Journal* 10 (10):2867–78.
- Navab, Roya, Jiang Liu, Isolde Seiden-Long, Warren Shih, Ming Li, Bizhan Bandarchi, Yan Chen, et al. 2009. "Co-Overexpression of Met and Hepatocyte Growth Factor Promotes Systemic Metastasis in NCI-H460 Non-Small Cell Lung Carcinoma Cells." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 11 (12):1292–1300.
- Neufeld, Gera, Adi D. Sabag, Noa Rabinovicz, and Ofra Kessler. 2012. "Semaphorins in Angiogenesis and Tumor Progression." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (1):a006718. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006718>.
- Nishino, T., H. Hisha, N. Nishino, M. Adachi, and S. Ikehara. 1995. "Hepatocyte Growth Factor as a Hematopoietic Regulator." *Blood* 85 (11):3093–3100.
- Nones, Katia, Nic Waddell, Sarah Song, Ann-Marie Patch, David Miller, Amber Johns, Jianmin Wu, et al. 2014. "Genome-Wide DNA Methylation Patterns in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveal Epigenetic Deregulation of SLIT-ROBO, ITGA2 and MET Signaling." *International Journal of Cancer* 135 (5):1110–18. <https://doi.org/10.1002/ijc.28765>.
- Noonan, Sinéad A., Lynne Berry, Xian Lu, Dexiang Gao, Anna E. Barón, Patrick Chesnut, Jamie Sheren, et al. 2016. "Identifying the Appropriate FISH Criteria for Defining MET Copy Number-Driven Lung Adenocarcinoma through Oncogene Overlap Analysis." *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 11 (8):1293–1304. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.04.033>.
- Noro, Rintaro, Masahiro Seike, Fenfei Zou, Chie Soeno, Kuniko Matsuda, Teppei Sugano, Nobuhiko Nishijima, et al. 2015. "MET FISH-Positive Status Predicts Short Progression-Free Survival and Overall Survival after Gefitinib Treatment in Lung Adenocarcinoma with EGFR Mutation." *BMC Cancer* 15 (February):31. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1019-1>.
- Novello, S., F. Barlesi, R. Califano, T. Cufer, S. Ekman, M. Giaj Levra, K. Kerr, et al. 2016. "Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up." *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 27 (suppl 5):v1–27. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw326>.
- O'Brien, Lucy Erin, Kitty Tang, Ellen S. Kats, Amy Schutz-Geschwender, Joshua H. Lipschutz, and Keith E. Mostov. 2004. "ERK and MMPs Sequentially Regulate Distinct Stages of Epithelial Tubule Development." *Developmental Cell* 7 (1):21–32. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.06.001>.
- Ogunwobi, Olorunseun O., and Chen Liu. 2011. "Hepatocyte Growth Factor Upregulation Promotes Carcinogenesis and Epithelial-Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma via Akt and COX-2 Pathways." *Clinical & Experimental Metastasis* 28 (8):721–31. <https://doi.org/10.1007/s10585-011-9404-x>.
- Ohya, Wakana, Hiroshi Funakoshi, Tsutomu Kurosawa, and Toshikazu Nakamura. 2007. "Hepatocyte Growth Factor (HGF) Promotes Oligodendrocyte Progenitor Cell Proliferation and Inhibits Its Differentiation during Postnatal Development in the Rat." *Brain Research* 1147 (May):51–65. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.02.045>.

Orian-Rousseau, Véronique, Linfeng Chen, Jonathan P. Sleeman, Peter Herrlich, and Helmut Ponta. 2002. "CD44 Is Required for Two Consecutive Steps in HGF/C-Met Signaling." *Genes & Development* 16 (23):3074–86. <https://doi.org/10.1101/gad.242602>.

Orian-Rousseau, Véronique, Helen Morrison, Alexandra Matzke, Thor Kastilan, Giuseppina Pace, Peter Herrlich, and Helmut Ponta. 2007. "Hepatocyte Growth Factor-Induced Ras Activation Requires ERM Proteins Linked to Both CD44v6 and F-Actin." *Molecular Biology of the Cell* 18 (1):76–83. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-08-0674>.

Ou, Sai-Hong Ignatius, Nikita Agarwal, and Siraj M. Ali. 2016. "High MET Amplification Level as a Resistance Mechanism to Osimertinib (AZD9291) in a Patient That Symptomatically Responded to Crizotinib Treatment Post-Osimertinib Progression." *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 98 (August):59–61. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.05.015>.

Ou, Sai-Hong Ignatius, Ramaswamy Govindan, Keith D. Eaton, Gregory A. Otterson, Martin E. Gutierrez, Alain C. Mita, Athanassios Argiris, et al. 2017. "Phase I Results from a Study of Crizotinib in Combination with Erlotinib in Patients with Advanced Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer." *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 12 (1):145–51. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.09.131>.

Oxnard, Geoffrey R., Maria E. Arcila, Camelia S. Sima, Gregory J. Riely, Juliann Chmielecki, Mark G. Kris, William Pao, Marc Ladanyi, and Vincent A. Miller. 2011. "Acquired Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Lung Cancer: Distinct Natural History of Patients with Tumors Harboring the T790M Mutation." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17 (6):1616–22. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2692>.

Oxnard, Geoffrey R., Peter C. Lo, Mizuki Nishino, Suzanne E. Dahlberg, Neal I. Lindeman, Mohit Butaney, David M. Jackman, Bruce E. Johnson, and Pasi A. Jänne. 2013. "Natural History and Molecular Characteristics of Lung Cancers Harboring EGFR Exon 20 Insertions." *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 8 (2):179–84. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3182779d18>.

Oxnard, Geoffrey R., Suresh S. Ramalingam, Myung-Ju Ahn, Sang-We Kim, Helena Alexandra Yu, Hideo Saka, Leora Horn, et al. 2015. "Preliminary Results of TATTON, a Multi-Arm Phase Ib Trial of AZD9291 Combined with MEDI4736, AZD6094 or Selumetinib in EGFR-Mutant Lung Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 33 (15_suppl):2509–2509. https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.2509.

Paez, J. Guillermo, Pasi A. Jänne, Jeffrey C. Lee, Sean Tracy, Heidi Greulich, Stacey Gabriel, Paula Herman, et al. 2004. "EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy." *Science (New York, N.Y.)* 304 (5676):1497–1500. <https://doi.org/10.1126/science.1099314>.

Paik, Paul K., Alexander Drilon, Pang-Dian Fan, Helena Yu, Natasha Rekhtman, Michelle S. Ginsberg, Laetitia Borsu, et al. 2015. "Response to MET Inhibitors in Patients with Stage IV Lung Adenocarcinomas Harboring MET Mutations Causing Exon 14 Skipping." *Cancer Discovery* 5 (8):842–49. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1467>.

Palamidessi, Andrea, Emanuela Frittoli, Massimiliano Garré, Mario Faretta, Marina Mione, Ilaria Testa, Alberto Diaspro, Letizia Lanzetti, Giorgio Scita, and Pier Paolo Di

- Fiore. 2008. "Endocytic Trafficking of Rac Is Required for the Spatial Restriction of Signaling in Cell Migration." *Cell* 134 (1):135–47. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.034>.
- Palka, Helena L., Morag Park, and Nicholas K. Tonks. 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 (8):5728–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210656200>.
- Parachoniak, Christine Anna, Yi Luo, Jasmine Vanessa Abella, James H. Keen, and Morag Park. 2011. "GGA3 Functions as a Switch to Promote Met Receptor Recycling, Essential for Sustained ERK and Cell Migration." *Developmental Cell* 20 (6):751–63. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.007>.
- Park, M., M. Dean, C. S. Cooper, M. Schmidt, S. J. O'Brien, D. G. Blair, and G. F. Vande Woude. 1986. "Mechanism of Met Oncogene Activation." *Cell* 45 (6):895–904.
- Park, M., M. Dean, K. Kaul, M. J. Braun, M. A. Gonda, and G. Vande Woude. 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 (18):6379–83.
- Park, Minseon, Hyelee Park, Wook-Hwan Kim, Hyeseong Cho, and Jae-Ho Lee. 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 (3):213–19. <https://doi.org/10.1038/emm.2005.29>.
- Park, Sanghui, Yoon-La Choi, Chang Ok Sung, Jungsuk An, Jinwon Seo, Myung-Ju Ahn, Jin Seok Ahn, et al. 2012. "High MET Copy Number and MET Overexpression: Poor Outcome in Non-Small Cell Lung Cancer Patients." *Histology and Histopathology* 27 (2):197–207.
- Park, Seongyeol, Jaemoon Koh, Dong-Wan Kim, Miso Kim, Bhumsuk Keam, Tae Min Kim, Yoon Kyung Jeon, Doo Hyun Chung, and Dae Seog Heo. 2015. "MET Amplification, Protein Expression, and Mutations in Pulmonary Adenocarcinoma." *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 90 (3):381–87. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.10.022>.
- Park, W. S., S. M. Dong, S. Y. Kim, E. Y. Na, M. S. Shin, J. H. Pi, B. J. Kim, et al. 1999. "Somatic Mutations in the Kinase Domain of the Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor Gene in Childhood Hepatocellular Carcinomas." *Cancer Research* 59 (2):307–10.
- Peek, Mark, Paul Moran, Nerissa Mendoza, Dineli Wickramasinghe, and Daniel Kirchhofer. 2002. "Unusual Proteolytic Activation of pro-Hepatocyte Growth Factor by Plasma Kallikrein and Coagulation Factor XIa." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (49):47804–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209778200>.
- Peled, Nir, Murry W. Wynes, Norihiko Ikeda, Tatsuo Ohira, Koichi Yoshida, Jin Qian, Maya Ilouze, et al. 2013. "Insulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R) as a Biomarker for Resistance to the Tyrosine Kinase Inhibitor Gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer." *Cellular Oncology (Dordrecht)* 36 (4):277–88. <https://doi.org/10.1007/s13402-013-0133-9>.
- Pelicci, G., S. Giordano, Z. Zhen, A. E. Salcini, L. Lanfrancone, A. Bardelli, G. Panayotou, M. D. Waterfield, C. Ponzetto, and P. G. Pelicci. 1995. "The Motogenic and Mitogenic Responses to HGF Are Amplified by the Shc Adaptor Protein." *Oncogene* 10 (8):1631–38.

- Peng, Zhi, Yan Zhu, Qianqian Wang, Jing Gao, Yilin Li, Yanyan Li, Sai Ge, and Lin Shen. 2014. "Prognostic Significance of MET Amplification and Expression in Gastric Cancer: A Systematic Review with Meta-Analysis." *PloS One* 9 (1):e84502. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084502>.
- Pennacchietti, Selma, Paolo Michieli, Maria Galluzzo, Massimiliano Mazzone, Silvia Giordano, and Paolo M. Comoglio. 2003. "Hypoxia Promotes Invasive Growth by Transcriptional Activation of the Met Protooncogene." *Cancer Cell* 3 (4):347–61.
- Peschard, P., T. M. Fournier, L. Lamorte, M. A. Naujokas, H. Band, W. Y. Langdon, and M. Park. 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 (5):995–1004.
- Peschard, P., and M. Park. 2007. "From Tpr-Met to Met, Tumorigenesis and Tubes." *Oncogene* 26 (9):1276–85. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210201>.
- Peschard, Pascal, Noboru Ishiyama, Tong Lin, Stan Lipkowitz, and Morag Park. 2004. "A Conserved DpYR Motif in the Juxtamembrane Domain of the Met Receptor Family Forms an Atypical c-Cbl/Cbl-B Tyrosine Kinase Binding Domain Binding Site Required for Suppression of Oncogenic Activation." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (28):29565–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403954200>.
- Petrelli, Annalisa, Giorgio F. Gilestro, Stefania Lanzardo, Paolo M. Comoglio, Nicola Migone, and Silvia Giordano. 2002. "The Endophilin-CIN85-Cbl Complex Mediates Ligand-Dependent Downregulation of c-Met." *Nature* 416 (6877):187–90. <https://doi.org/10.1038/416187a>.
- Piotrowska, Zofia, Kenneth Stephen Thress, Meghan Mooradian, Rebecca Suk Heist, Christopher G. Azzoli, Jennifer S. Temel, Coleen Rizzo, et al. 2017. "MET Amplification (Amp) as a Resistance Mechanism to Osimertinib." *Journal of Clinical Oncology* 35 (15_suppl):9020–9020. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.9020.
- Pluquet, Emilie, Jacques Cadranel, Anne Legendre, Michelle Beau Faller, Pierre Jean Souquet, Gerard Zalcman, Maurice Perol, et al. 2010. "Osteoblastic Reaction in Non-Small Cell Lung Carcinoma and Its Association to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors Response and Prolonged Survival." *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 5 (4):491–96. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181cf0440>.
- Ponzetto, C., A. Bardelli, F. Maina, P. Longati, G. Panayotou, R. Dhand, M. D. Waterfield, and P. M. Comoglio. 1993. "A Novel Recognition Motif for Phosphatidylinositol 3-Kinase Binding Mediates Its Association with the Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Receptor." *Molecular and Cellular Biology* 13 (8):4600–4608.
- Ponzetto, C., A. Bardelli, Z. Zhen, F. Maina, P. dalla Zonca, S. Giordano, A. Graziani, G. Panayotou, and P. M. Comoglio. 1994. "A Multifunctional Docking Site Mediates Signaling and Transformation by the Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Receptor Family." *Cell* 77 (2):261–71.
- Ponzetto, C., S. Giordano, F. Peverali, G. Della Valle, M. L. Abate, G. Vaula, and P. M. Comoglio. 1991. "C-Met Is Amplified but Not Mutated in a Cell Line with an Activated Met Tyrosine Kinase." *Oncogene* 6 (4):553–59.
- Ponzo, Marisa G., Robert Lesurf, Stephanie Petkiewicz, Frances P. O'Malley, Dushanthi Pinnaduwege, Irene L. Andrulis, Shelley B. Bull, 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 (31):12903–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810402106>.

Potempa, S., and A. J. Ridley. 1998. "Activation of Both MAP Kinase and Phosphatidylinositide 3-Kinase by Ras Is Required for Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor-Induced Adherens Junction Disassembly." *Molecular Biology of the Cell* 9 (8):2185–2200.

Powell, Elizabeth M., Daniel B. Campbell, Gregg D. Stanwood, Caleb Davis, Jeffrey L. Noebels, and Pat Levitt. 2003. "Genetic Disruption of Cortical Interneuron Development Causes Region- and GABA Cell Type-Specific Deficits, Epilepsy, and Behavioral Dysfunction." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (2):622–31.

Prat, M., R. P. Narsimhan, T. Crepaldi, M. R. Nicotra, P. G. Natali, and P. M. Comoglio. 1991. "The Receptor Encoded by the Human c-MET Oncogene Is Expressed in Hepatocytes, Epithelial Cells and Solid Tumors." *International Journal of Cancer* 49 (3):323–28.

Prunotto, Chiara, Tiziana Crepaldi, Paolo E. Forni, Alessandro Ieraci, Robert G. Kelly, Shahragim Tajbakhsh, Margaret Buckingham, and Carola Ponzetto. 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 (3):582–91. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20177>.

Pyo, Jung-Soo, Guhyun Kang, and Hyunjin Cho. 2016. "Clinicopathological Significance and Diagnostic Accuracy of c-MET Expression by Immunohistochemistry in Gastric Cancer: A Meta-Analysis." *Journal of Gastric Cancer* 16 (3):141–51. <https://doi.org/10.5230/jgc.2016.16.3.141>.

Rahimi, N., W. Hung, E. Tremblay, R. Saulnier, and B. Elliott. 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 (50):33714–21.

Rahman, Salman, Yatin Patel, Jacqueline Murray, Kirti V. Patel, Rushika Sumathipala, Michael Sobel, and Errol S. Wijelath. 2005. "Novel Hepatocyte Growth Factor (HGF) Binding Domains on Fibronectin and Vitronectin Coordinate a Distinct and Amplified Met-Integrin Induced Signalling Pathway in Endothelial Cells." *BMC Cell Biology* 6 (1):8. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-6-8>.

Ramalingam, S., T. Reungwetwattana, B. Chewaskulyong, A. Dechaphunkul, K. H. Lee, F. Imamura, N. Nogami, et al. 2017. "LBA2_PROsimertinib vs Standard of Care (SoC) EGFR-TKI as First-Line Therapy in Patients (Pts) with EGFRm Advanced NSCLC: FLAURA." *Annals of Oncology* 28 (suppl_5). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx440.050>.

Rege-Cambrin, G., P. Scaravaglio, F. Carozzi, S. Giordano, C. Ponzetto, P. M. Comoglio, and G. Saglio. 1992. "Karyotypic Analysis of Gastric Carcinoma Cell Lines Carrying an Amplified c-Met Oncogene." *Cancer Genetics and Cytogenetics* 64 (2):170–73.

Reshetnikova, Galina, Sergei Troyanovsky, and David L. Rimm. 2007. "Definition of a Direct Extracellular Interaction between Met and E-Cadherin." *Cell Biology International* 31 (4):366–73. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.01.022>.

Reznik, Thomas E., Yingying Sang, Yongxian Ma, Roger Abounader, Eliot M. Rosen, Shuli Xia, and John Laterra. 2008. "Transcription-Dependent Epidermal Growth Factor

- Receptor Activation by Hepatocyte Growth Factor." *Molecular Cancer Research: MCR* 6 (1):139–50. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0236>.
- Riely, Gregory J. 2008. "Second-Generation Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer." *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 3 (6 Suppl 2):S146-149. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318174e96e>.
- Robinson, D. R., Y. M. Wu, and S. F. Lin. 2000. "The Protein Tyrosine Kinase Family of the Human Genome." *Oncogene* 19 (49):5548–57. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203957>.
- Rodrigues, G. A., M. A. Naujokas, and M. Park. 1991. "Alternative Splicing Generates Isoforms of the Met Receptor Tyrosine Kinase Which Undergo Differential Processing." *Molecular and Cellular Biology* 11 (6):2962–70.
- Rodrigues, Sonia P., Kelly E. Fathers, Gabriel Chan, Dongmei Zuo, Fawaz Halwani, Sarkis Meterissian, and Morag Park. 2005. "CrkI and CrkII Function as Key Signaling Integrators for Migration and Invasion of Cancer Cells." *Molecular Cancer Research: MCR* 3 (4):183–94. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-04-0211>.
- Ronsin, C., F. Muscatelli, M. G. Mattei, and R. Breathnach. 1993. "A Novel Putative Receptor Protein Tyrosine Kinase of the Met Family." *Oncogene* 8 (5):1195–1202.
- Rosell, Rafael, Enric Carcereny, Radj Gervais, Alain Vergnenegre, Bartomeu Massuti, Enriqueta Felip, Ramon Palmero, et al. 2012. "Erlotinib versus Standard Chemotherapy as First-Line Treatment for European Patients with Advanced EGFR Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer (EURTAC): A Multicentre, Open-Label, Randomised Phase 3 Trial." *The Lancet. Oncology* 13 (3):239–46. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70393-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70393-X).
- Royal, I., N. Lamarche-Vane, L. Lamorte, K. Kaibuchi, and M. Park. 2000. "Activation of cdc42, Rac, PAK, and Rho-Kinase in Response to Hepatocyte Growth Factor Differentially Regulates Epithelial Cell Colony Spreading and Dissociation." *Molecular Biology of the Cell* 11 (5):1709–25.
- Royal, I., and M. Park. 1995. "Hepatocyte Growth Factor-Induced Scatter of Madin-Darby Canine Kidney Cells Requires Phosphatidylinositol 3-Kinase." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (46):27780–87.
- Sakkab, D., M. Lewitzky, G. Posern, U. Schaeper, M. Sachs, W. Birchmeier, and S. M. Feller. 2000. "Signaling of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF) to the Small GTPase Rap1 via the Large Docking Protein Gab1 and the Adapter Protein CRKL." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (15):10772–78.
- Sangwan, Veena, Grigorios N. Paliouras, Jasmine V. Abella, Nadia Dubé, Anie Monast, Michel L. Tremblay, and Morag Park. 2008. "Regulation of the Met Receptor-Tyrosine Kinase by the Protein-Tyrosine Phosphatase 1B and T-Cell Phosphatase." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (49):34374–83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805916200>.
- Scagliotti, Giorgio, Joachim von Pawel, Silvia Novello, Rodryg Ramlau, Adolfo Favaretto, Fabrice Barlesi, Wallace Akerley, et al. 2015. "Phase III Multinational, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Tivantinib (ARQ 197) Plus Erlotinib Versus Erlotinib Alone in Previously Treated Patients With Locally Advanced or Metastatic Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (24):2667–74. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.7317>.

- Scagliotti, Giorgio V, Silvia Novello, and Joachim von Pawel. 2013. "The Emerging Role of MET/HGF Inhibitors in Oncology." *Cancer Treatment Reviews* 39 (7):793–801. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.02.001>.
- Schaeper, U., N. H. Gehring, K. P. Fuchs, M. Sachs, B. Kempkes, and W. Birchmeier. 2000. "Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 Mediates Biological Responses." *The Journal of Cell Biology* 149 (7):1419–32.
- Schelter, Florian, Julia Kobuch, Marcia L. Moss, J. David Becherer, Paolo M. Comoglio, Carla Boccaccio, and Achim Krüger. 2010. "A Disintegrin and Metalloproteinase-10 (ADAM-10) Mediates DN30 Antibody-Induced Shedding of the Met Surface Receptor." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (34):26335–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.106435>.
- Schiering, Nikolaus, Stefan Knapp, Marina Marconi, Maria M. Flocco, Jean Cui, Rita Perego, Luisa Rusconi, and Cinzia Cristiani. 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 (22):12654–59. <https://doi.org/10.1073/pnas.1734128100>.
- Schildhaus, Hans-Ulrich, Anne M. Schultheis, Josef Rüschoff, Elke Binot, Sabine Merkelbach-Bruse, Jana Fassunke, Wolfgang Schulte, et al. 2015. "MET Amplification Status in Therapy-Naïve Adeno- and Squamous Cell Carcinomas of the Lung." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 21 (4):907–15. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0450>.
- Schlessinger, J. 2000. "Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases." *Cell* 103 (2):211–25.
- Schmidt, C., F. Bladt, S. Goedecke, V. Brinkmann, W. Zschiesche, M. Sharpe, E. Gherardi, and C. Birchmeier. 1995. "Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor Is Essential for Liver Development." *Nature* 373 (6516):699–702. <https://doi.org/10.1038/373699a0>.
- Schmidt, L., F. M. Duh, F. Chen, T. Kishida, G. Glenn, P. Choyke, S. W. Scherer, et al. 1997. "Germline and Somatic Mutations in the Tyrosine Kinase Domain of the MET Proto-Oncogene in Papillary Renal Carcinomas." *Nature Genetics* 16 (1):68–73. <https://doi.org/10.1038/ng0597-68>.
- Schmidt, L., K. Junker, G. Weirich, G. Glenn, P. Choyke, I. Lubensky, Z. Zhuang, et al. 1998. "Two North American Families with Hereditary Papillary Renal Carcinoma and Identical Novel Mutations in the MET Proto-Oncogene." *Cancer Research* 58 (8):1719–22.
- Schneider, Marlon R., and Eckhard Wolf. 2009. "The Epidermal Growth Factor Receptor Ligands at a Glance." *Journal of Cellular Physiology* 218 (3):460–66. <https://doi.org/10.1002/jcp.21635>.
- Schrock, Alexa B., Garrett M. Frampton, James Suh, Zachary R. Chalmers, Mark Rosenzweig, Rachel L. Erlich, Balazs Halmos, et al. 2016. "Characterization of 298 Patients with Lung Cancer Harboring MET Exon 14 Skipping Alterations." *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 11 (9):1493–1502. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.06.004>.
- Schuller, Alwin G., Evan R. Barry, Rhys D. O. Jones, Ryan E. Henry, Melanie M. Frigault, Garry Beran, David Linsenmayer, et al. 2015. "The MET Inhibitor AZD6094 (Savolitinib, HMPL-504) Induces Regression in Papillary Renal Cell Carcinoma Patient-Derived Xenograft Models." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American*

Association for Cancer Research 21 (12):2811–19. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2685>.

Schulze-Bergkamen, Henning, Dirk Brenner, Andreas Krueger, Dorothee Suess, Stefanie C. Fas, Christian R. Frey, Andreas Dax, et al. 2004. "Hepatocyte Growth Factor Induces Mcl-1 in Primary Human Hepatocytes and Inhibits CD95-Mediated Apoptosis via Akt." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 39 (3):645–54. <https://doi.org/10.1002/hep.20138>.

Seki, T., M. Hagiya, M. Shimonishi, T. Nakamura, and S. Shimizu. 1991. "Organization of the Human Hepatocyte Growth Factor-Encoding Gene." *Gene* 102 (2):213–19.

Seol, D. W., Q. Chen, and R. Zarnegar. 2000. "Transcriptional Activation of the Hepatocyte Growth Factor Receptor (c-Met) Gene by Its Ligand (Hepatocyte Growth Factor) Is Mediated through AP-1." *Oncogene* 19 (9):1132–37. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203404>.

Sequist, Lecia V, Belinda A Waltman, Dora Dias-Santagata, Subba Digumarthy, Alexa B Turke, Panos Fidias, Kristin Bergethon, et al. 2011. "Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors." *Science Translational Medicine* 3 (75):75ra26. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002003>.

Shattuck, David L., Jamie K. Miller, Kermit L. Carraway, and Colleen Sweeney. 2008. "Met Receptor Contributes to Trastuzumab Resistance of Her2-Overexpressing Breast Cancer Cells." *Cancer Research* 68 (5):1471–77. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5962>.

Shieh, Jiunn-Min, Yen-An Tang, Tsung-Han Yang, Chih-Yi Chen, Han-Shui Hsu, Yi-Hung Carol Tan, Ravi Salgia, and Yi-Ching Wang. 2013. "Lack of Association of C-Met-N375S Sequence Variant with Lung Cancer Susceptibility and Prognosis." *International Journal of Medical Sciences* 10 (8):988–94. <https://doi.org/10.7150/ijms.5944>.

Shimamura, Munehisa, Naoyuki Sato, Masataka Sata, Kouji Wakayama, Toshio Ogihara, and Ryuichi Morishita. 2007. "Expression of Hepatocyte Growth Factor and c-Met after Spinal Cord Injury in Rats." *Brain Research* 1151 (June):188–94. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.03.022>.

Shimomura, T., J. Kondo, M. Ochiai, D. Naka, K. Miyazawa, Y. Morimoto, and N. Kitamura. 1993. "Activation of the Zymogen of Hepatocyte Growth Factor Activator by Thrombin." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (30):22927–32.

Sibilia, Maria, Renate Kroismayr, Beate M. Lichtenberger, Anuradha Natarajan, Manfred Hecking, and Martin Holcman. 2007. "The Epidermal Growth Factor Receptor: From Development to Tumorigenesis." *Differentiation; Research in Biological Diversity* 75 (9):770–87. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00238.x>.

Siegel, Rebecca, Carol DeSantis, Katherine Virgo, Kevin Stein, Angela Mariotto, Tenbroeck Smith, Dexter Cooper, et al. 2012. "Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2012." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 62 (4):220–41. <https://doi.org/10.3322/caac.21149>.

Siegfried, J M, L A Weissfeld, P Singh-Kaw, R J Weyant, J R Testa, and R J Landreneau. 1997. "Association of Immunoreactive Hepatocyte Growth Factor with Poor Survival in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer." *Cancer Research* 57 (3):433–39.

Singh, Pankaj K., Michelle E. Behrens, John P. Eggers, Ronald L. Cerny, Jennifer M. Bailey, Kandavel Shanmugam, Sandra J. Gendler, Eric P. Bennett, and Michael A. Hollingsworth.

2008. "Phosphorylation of MUC1 by Met Modulates Interaction with p53 and MMP1 Expression." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (40):26985–95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805036200>.

Singleton, Patrick A., Ravi Salgia, Liliana Moreno-Vinasco, Jaideep Moitra, Saad Sammani, Tamara Mirzapozova, and Joe G. N. Garcia. 2007. "CD44 Regulates Hepatocyte Growth Factor-Mediated Vascular Integrity. Role of c-Met, Tiam1/Rac1, Dynamin 2, and Cortactin." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (42):30643–57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702573200>.

Skouteris, G. G., and E. Georgakopoulos. 1996. "Hepatocyte Growth Factor-Induced Proliferation of Primary Hepatocytes Is Mediated by Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 218 (1):229–33. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0040>.

Smith, Jacob M., Jennifer Xu, and Elizabeth M. Powell. 2012. "Age Dependent Forebrain Structural Changes in Mice Deficient in the Autism Associated Gene Met Tyrosine Kinase." *NeuroImage. Clinical* 1 (1):66–74. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2012.09.002>.

Smolen, Gromoslaw A., Raffaella Sordella, Beth Muir, Gayatry Mohapatra, Anne Barmettler, Heidi Archibald, Woo J. Kim, 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 (7):2316–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508776103>.

Smyth, Lesley Ann, and Hugh J. M. Brady. 2005. "cMet and Fas Receptor Interaction Inhibits Death-Inducing Signaling Complex Formation in Endothelial Cells." *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 46 (1):100–106. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000167991.82153.16>.

Sonnenberg, E., D. Meyer, K. M. Weidner, and C. Birchmeier. 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 (1):223–35.

Soong, Joanne, and Glynis Scott. 2013. "Plexin B1 Inhibits MET through Direct Association and Regulates Shp2 Expression in Melanocytes." *Journal of Cell Science* 126 (Pt 2):688–95. <https://doi.org/10.1242/jcs.119487>.

Soucheray, Margaret, Marzia Capelletti, Inés Pulido, Yanan Kuang, Cloud P. Paweletz, Jeffrey H. Becker, Eiki Kikuchi, et al. 2015. "Intratatumoral Heterogeneity in EGFR-Mutant NSCLC Results in Divergent Resistance Mechanisms in Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibition." *Cancer Research* 75 (20):4372–83. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0377>.

Sousa, Inês, Taane G. Clark, Claudio Toma, Kazuhiro Kobayashi, Maja Choma, Richard Holt, Nuala H. Sykes, et al. 2009. "MET and Autism Susceptibility: Family and Case-Control Studies." *European Journal of Human Genetics: EJHG* 17 (6):749–58. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.215>.

Spigel, David R., Martin J. Edelman, Kenneth O'Byrne, Luis Paz-Ares, Simonetta Mocci, See Phan, David S. Shames, et al. 2017. "Results From the Phase III Randomized Trial of Onartuzumab Plus Erlotinib Versus Erlotinib in Previously Treated Stage IIIB or IV Non-Small-Cell Lung Cancer: METLung." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the*

American Society of Clinical Oncology 35 (4):412–20.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2016.69.2160>.

Spigel, David R, Thomas J Ervin, Rodryg A Ramlau, Davey B Daniel, Jerome H Goldschmidt Jr, George R Blumenschein Jr, Maciej J Krzakowski, 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 (32):4105–14.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2012.47.4189>.

Sridhar, S. C., and C. K. Miranti. 2006. “Tetraspanin KAI1/CD82 Suppresses Invasion by Inhibiting Integrin-Dependent Crosstalk with c-Met Receptor and Src Kinases.” *Oncogene* 25 (16):2367–78. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209269>.

Stamos, Jennifer, Robert A. Lazarus, Xiaoyi Yao, Daniel Kirchhofer, and Christian Wiesmann. 2004. “Crystal Structure of the HGF Beta-Chain in Complex with the Sema Domain of the Met Receptor.” *The EMBO Journal* 23 (12):2325–35.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600243>.

Stefan, M., A. Koch, A. Mancini, A. Mohr, K. M. Weidner, H. Niemann, and T. Tamura. 2001. “Src Homology 2-Containing Inositol 5-Phosphatase 1 Binds to the Multifunctional Docking Site of c-Met and Potentiates Hepatocyte Growth Factor-Induced Branching Tubulogenesis.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (5):3017–23.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M009333200>.

Stevens, Laurel, Lindy McClelland, Alex Fricke, Magali Williamson, Ihsin Kuo, and Glynis Scott. 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 (6):1636–45. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.13>.

Stoker, M., E. Gherardi, M. Perryman, and J. Gray. 1987. “Scatter Factor Is a Fibroblast-Derived Modulator of Epithelial Cell Mobility.” *Nature* 327 (6119):239–42.
<https://doi.org/10.1038/327239a0>.

Stoker, M., and M. Perryman. 1985. “An Epithelial Scatter Factor Released by Embryo Fibroblasts.” *Journal of Cell Science* 77 (August):209–23.

Sun, Chengcao, Ming Sang, Shujun Li, Xiaodong Sun, Cuili Yang, Yongyong Xi, Liang Wang, et al. 2015. “Hsa-miR-139-5p Inhibits Proliferation and Causes Apoptosis Associated with down-Regulation of c-Met.” *Oncotarget* 6 (37):39756–92.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.5476>.

Sun, Jong-Mu, Myung-Ju Ahn, Yoon-La Choi, Jin Seok Ahn, and Keunchil Park. 2013. “Clinical Implications of T790M Mutation in Patients with Acquired Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors.” *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 82 (2):294–98.
<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.08.023>.

Sun, Tianliang, Rameshkumar Krishnan, and Jakub M. Swiercz. 2012. “Grb2 Mediates Semaphorin-4D-Dependent RhoA Inactivation.” *Journal of Cell Science* 125 (Pt 15):3557–67. <https://doi.org/10.1242/jcs.101063>.

Taher, Taher E. I., Esther P. M. Tjin, Esther A. Beuling, Jannie Borst, Marcel Spaargaren, and Steven T. Pals. 2002. “C-Cbl Is Involved in Met Signaling in B Cells and Mediates Hepatocyte Growth Factor-Induced Receptor Ubiquitination.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (7):3793–3800.

- Takayama, H., W. J. LaRochelle, R. Sharp, T. Otsuka, P. Kriebel, M. Anver, S. A. Aaronson, and G. Merlino. 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 (2):701–6.
- Takeuchi, K., S. Shibamoto, K. Nagamine, I. Shigemori, S. Omura, N. Kitamura, and F. Ito. 2001. "Signaling Pathways Leading to Transcription and Translation Cooperatively Regulate the Transient Increase in Expression of c-Fos Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (28):26077–83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102704200>.
- Takezawa, Ken, Valentina Pirazzoli, Maria E. Arcila, Caroline A. Nebhan, Xiaoling Song, Elisa de Stanchina, Kadoaki Ohashi, et al. 2012. "HER2 Amplification: A Potential Mechanism of Acquired Resistance to EGFR Inhibition in EGFR-Mutant Lung Cancers That Lack the Second-Site EGFR T790M Mutation." *Cancer Discovery* 2 (10):922–33. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0108>.
- Tamagnone, L., S. Artigiani, H. Chen, Z. He, G. I. Ming, H. Song, A. Chedotal, et al. 1999. "Plexins Are a Large Family of Receptors for Transmembrane, Secreted, and GPI-Anchored Semaphorins in Vertebrates." *Cell* 99 (1):71–80.
- Tanimoto, Shuji, Tomoharu Fukumori, Gad El-Moula, Avirmed Shiirevnyamba, Shinichiro Kinouchi, Takahiro Koizumi, Ryoichi Nakanishi, et al. 2008. "Prognostic Significance of Serum Hepatocyte Growth Factor in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Comparison with Serum Vascular Endothelial Growth Factor." *The Journal of Medical Investigation: JMI* 55 (1–2):106–11.
- Tanizaki, J., I. Okamoto, K. Sakai, and K. Nakagawa. 2011. "Differential Roles of Trans-Phosphorylated EGFR, HER2, HER3, and RET as Heterodimerisation Partners of MET in Lung Cancer with MET Amplification." *British Journal of Cancer* 105 (6):807–13. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.322>.
- Tempest, P. R., M. R. Stratton, and C. S. Cooper. 1988. "Structure of the Met Protein and Variation of Met Protein Kinase Activity among Human Tumour Cell Lines." *British Journal of Cancer* 58 (1):3–7.
- Todeschini, Adriane Regina, Jose Nilson Dos Santos, Kazuko Handa, and Sen-itiroh Hakomori. 2007. "Ganglioside GM2-Tetraspanin CD82 Complex Inhibits Met and Its Cross-Talk with Integrins, Providing a Basis for Control of Cell Motility through Glycosynapse." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (11):8123–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611407200>.
- Toi, M., T. Taniguchi, T. Ueno, M. Asano, N. Funata, K. Sekiguchi, H. Iwanari, and T. Tominaga. 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 (3):659–64.
- Tong, J. H., S. F. Yeung, A. W. H. Chan, L. Y. Chung, S. L. Chau, R. W. M. Lung, C. Y. Tong, et al. 2016. "MET Amplification and Exon 14 Splice Site Mutation Define Unique Molecular Subgroups of Non-Small Cell Lung Carcinoma with Poor Prognosis." *Clinical Cancer Research* 22 (12):3048–56. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2061>.
- Tong, Yufeng, Preeti Chugh, Prasanta K. Hota, Rebecca S. Alviani, Mei Li, Wolfram Tempel, Limin Shen, Hee-Won Park, and Matthias Buck. 2007. "Binding of Rac1, Rnd1, and RhoD to a Novel Rho GTPase Interaction Motif Destabilizes Dimerization of the

- Plexin-B1 Effector Domain." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (51):37215–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703800200>.
- Torre, Lindsey A., Freddie Bray, Rebecca L. Siegel, Jacques Ferlay, Joannie Lortet-Tieulent, and Ahmedin Jemal. 2015. "Global Cancer Statistics, 2012." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 65 (2):87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.
- Tran, Thang N., Christina I. Selinger, Maija R. J. Kohonen-Corish, Brian McCaughan, Catherine Kennedy, Sandra A. O'Toole, and Wendy A. Cooper. 2016. "Alterations of MET Gene Copy Number and Protein Expression in Primary Non-Small-Cell Lung Cancer and Corresponding Nodal Metastases." *Clinical Lung Cancer* 17 (1):30–38.e1. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2015.08.002>.
- Trusolino, L., A. Bertotti, and P. M. Comoglio. 2001. "A Signaling Adapter Function for alpha6beta4 Integrin in the Control of HGF-Dependent Invasive Growth." *Cell* 107 (5):643–54.
- Trusolino, L., S. Cavassa, P. Angelini, M. Andó, A. Bertotti, P. M. Comoglio, and C. Boccaccio. 2000. "HGF/Scatter Factor Selectively Promotes Cell Invasion by Increasing Integrin Avidity." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14 (11):1629–40.
- Tsao, M. S., Y. Yang, A. Marcus, N. Liu, and L. Mou. 2001. "Hepatocyte Growth Factor Is Predominantly Expressed by the Carcinoma Cells in Non-Small-Cell Lung Cancer." *Human Pathology* 32 (1):57–65. <https://doi.org/10.1053/hupa.2001.21133>.
- Tsuta, Koji, Yoshiki Kozu, Takahiro Mimae, Akihiko Yoshida, Takashi Kohno, Ikuo Sekine, Tomohide Tamura, Hisao Asamura, Koh Furuta, and Hitoshi Tsuda. 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 (2):331–39. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318241655f>.
- Tulasne, David, Julien Deheuninck, Filipe Calheiros Lourenco, Fabienne Lamballe, Zongling Ji, Catherine Leroy, Emilie Puchois, et al. 2004. "Proapoptotic Function of the MET Tyrosine Kinase Receptor through Caspase Cleavage." *Molecular and Cellular Biology* 24 (23):10328–39. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.23.10328-10339.2004>.
- Tulasne, David, Rejane Paumelle, Catherine Leroy, Sylvie Reveneau, Bernard Vandenbunder, and Veronique Fafeur. 2002. "Involvement of RAS-ERK Signaling in Multiple Biological Responses to HGF/SF." *Annals of the New York Academy of Sciences* 973 (November):105–8.
- Turke, Alexa B., Kreshnik Zejnullahu, Yi-Long Wu, Youngchul Song, Dora Dias-Santagata, Eugene Lifshits, Luca Toschi, et al. 2010. "Preexistence and Clonal Selection of MET Amplification in EGFR Mutant NSCLC." *Cancer Cell* 17 (1):77–88. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.11.022>.
- Tyner, Jeffrey W., Luke B. Fletcher, Ellen Q. Wang, Wayne F. Yang, Michael L. Rutenbergschoenberg, Carol Beadling, Motomi Mori, et al. 2010. "MET Receptor Sequence Variants R970C and T992I Lack Transforming Capacity." *Cancer Research* 70 (15):6233–37. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0429>.
- Uehara, Y., O. Minowa, C. Mori, K. Shiota, J. Kuno, T. Noda, and N. Kitamura. 1995. "Placental Defect and Embryonic Lethality in Mice Lacking Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor." *Nature* 373 (6516):702–5. <https://doi.org/10.1038/373702a0>.

- Uramoto, Hidetaka, Teruo Iwata, Takamitsu Onitsuka, Hidehiko Shimokawa, Takeshi Hanagiri, and Tsunehiro Oyama. 2010. "Epithelial-Mesenchymal Transition in EGFR-TKI Acquired Resistant Lung Adenocarcinoma." *Anticancer Research* 30 (7):2513–17.
- Vadnais, Julie, Geneviève Nault, Zeinab Daher, Mohammad Amraei, Yolaine Dodier, Ivan Robert Nabi, and Josette Noël. 2002. "Autocrine Activation of the Hepatocyte Growth Factor Receptor/Met Tyrosine Kinase Induces Tumor Cell Motility by Regulating Pseudopodial Protrusion." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (50):48342–50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209481200>.
- Veenstra, Cynthia, Gizeh Pérez-Tenorio, Anna Stelling, Elin Karlsson, Sanam Mirwani Mirwani, Bo Nordensköld, Tommy Fornander, and Olle Stål. 2016. "Met and Its Ligand HGF Are Associated with Clinical Outcome in Breast Cancer." *Oncotarget* 7 (24):37145–59. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9268>.
- Vigna, E., D. Gramaglia, P. Longati, A. Bardelli, and P. M. Comoglio. 1999. "Loss of the Exon Encoding the Juxtamembrane Domain Is Essential for the Oncogenic Activation of TPR-MET." *Oncogene* 18 (29):4275–81. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202791>.
- Voort, R. van der, T. E. Taher, V. J. Wielenga, M. Spaargaren, R. Prevo, L. Smit, G. David, G. Hartmann, E. Gherardi, and S. T. Pals. 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 (10):6499–6506.
- Wang, Kai, Ho Yeong Lim, Stephanie Shi, Jeeyun Lee, Shibing Deng, Tao Xie, Zhou Zhu, et al. 2013. "Genomic Landscape of Copy Number Aberrations Enables the Identification of Oncogenic Drivers in Hepatocellular Carcinoma." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 58 (2):706–17. <https://doi.org/10.1002/hep.26402>.
- Wang, R, L D Ferrell, S Faouzi, J J Maher, and J M Bishop. 2001. "Activation of the Met Receptor by Cell Attachment Induces and Sustains Hepatocellular Carcinomas in Transgenic Mice." *The Journal of Cell Biology* 153 (5):1023–34.
- Wang, Xue, Marie C. DeFrances, Yu Dai, Peter Padiaditakis, Carla Johnson, Aaron Bell, George K. Michalopoulos, and Reza Zarnegar. 2002. "A Mechanism of Cell Survival: Sequestration of Fas by the HGF Receptor Met." *Molecular Cell* 9 (2):411–21.
- Watermann, I., B. Schmitt, F. Stellmacher, J. Müller, R. Gaber, Ch Kugler, N. Reinmuth, et al. 2015. "Improved Diagnostics Targeting c-MET in Non-Small Cell Lung Cancer: Expression, Amplification and Activation?" *Diagnostic Pathology* 10 (July):130. <https://doi.org/10.1186/s13000-015-0362-5>.
- Weber, G. F., S. Ashkar, M. J. Glimcher, and H. Cantor. 1996. "Receptor-Ligand Interaction between CD44 and Osteopontin (Eta-1)." *Science (New York, N.Y.)* 271 (5248):509–12.
- Weidner, K. M., N. Arakaki, G. Hartmann, J. Vandekerckhove, S. Weingart, H. Rieder, C. Fonatsch, H. Tsubouchi, T. Hishida, and Y. Daikuhara. 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 (16):7001–5.
- Weidner, K. M., S. Di Cesare, M. Sachs, V. Brinkmann, J. Behrens, and W. Birchmeier. 1996. "Interaction between Gab1 and the c-Met Receptor Tyrosine Kinase Is Responsible for Epithelial Morphogenesis." *Nature* 384 (6605):173–76. <https://doi.org/10.1038/384173a0>.

- Wells, Claire M., Arie Abo, and Anne J. Ridley. 2002. "PAK4 Is Activated via PI3K in HGF-Stimulated Epithelial Cells." *Journal of Cell Science* 115 (Pt 20):3947–56.
- Winograd-Katz, Sabina E., Reinhard Fässler, Benjamin Geiger, and Kyle R. Legate. 2014. "The Integrin Adhesome: From Genes and Proteins to Human Disease." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (4):273–88. <https://doi.org/10.1038/nrm3769>.
- Wislez, Marie, Nathalie Rabbe, Joëlle Marchal, Bernard Milleron, Bruno Crestani, Charles Mayaud, Martine Antoine, Paul Soler, and Jacques Cadranel. 2003. "Hepatocyte Growth Factor Production by Neutrophils Infiltrating Bronchioloalveolar Subtype Pulmonary Adenocarcinoma: Role in Tumor Progression and Death." *Cancer Research* 63 (6):1405–12.
- Wu, Yi-Long, Dong-Wan Kim, Enriqueta Felip, Li Zhang, Xiaoqing Liu, Cai Cun Zhou, Dae Ho Lee, et al. 2016. "Phase (Ph) II Safety and Efficacy Results of a Single-Arm Ph Ib/II Study of Capmatinib (INC280) + Gefitinib in Patients (Pts) with EGFR-Mutated (Mut), cMET-Positive (cMET+) Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)." *Journal of Clinical Oncology* 34 (suppl; abstr 9020). <http://meetinglibrary.asco.org/content/165978-176>.
- Wu, Yi-Long, Caicun Zhou, Cheng-Ping Hu, Jifeng Feng, Shun Lu, Yunchao Huang, Wei Li, et al. 2014. "Afatinib versus Cisplatin plus Gemcitabine for First-Line Treatment of Asian Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring EGFR Mutations (LUX-Lung 6): An Open-Label, Randomised Phase 3 Trial." *The Lancet. Oncology* 15 (2):213–22. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70604-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70604-1).
- Xiao, G. H., M. Jeffers, A. Bellacosa, Y. Mitsuuchi, G. F. Vande Woude, and J. R. Testa. 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 (1):247–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.011532898>.
- Xu, Yiru, Wei Xia, Dustin Baker, Jin Zhou, Hyuk Chol Cha, John J. Voorhees, and Gary J. Fisher. 2011. "Receptor-Type Protein Tyrosine Phosphatase Beta (RPTP-Beta) Directly Dephosphorylates and Regulates Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR/Met) Function." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (18):15980–88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.212597>.
- Xu, Yiru, Jin Zhou, Thomas E. Carey, Jonathan B. McHugh, John J. Voorhees, and Gary J. Fisher. 2012. "Receptor-Type Protein Tyrosine Phosphatase β Regulates Met Phosphorylation and Function in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 14 (11):1015–22.
- Yamamoto, Natsumi, Gunay Mammadova, Robert X.-D. Song, Yasuo Fukami, and Ken-ichi Sato. 2006. "Tyrosine Phosphorylation of p145met Mediated by EGFR and Src Is Required for Serum-Independent Survival of Human Bladder Carcinoma Cells." *Journal of Cell Science* 119 (Pt 22):4623–33. <https://doi.org/10.1242/jcs.03236>.
- Yan, Shunchao, Xin Jiao, Huawei Zou, and Kai Li. 2015. "Prognostic Significance of c-Met in Breast Cancer: A Meta-Analysis of 6010 Cases." *Diagnostic Pathology* 10 (June):62. <https://doi.org/10.1186/s13000-015-0296-y>.
- Yanagita, K., K. Matsumoto, K. Sekiguchi, H. Ishibashi, Y. Niho, and T. Nakamura. 1993. "Hepatocyte Growth Factor May Act as a Pulmotrophic Factor on Lung Regeneration after Acute Lung Injury." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (28):21212–17.

- Yang, Hua, Chongjian Zhang, and Shude Cui. 2015. "Expression of Hepatocyte Growth Factor in Breast Cancer and Its Effect on Prognosis and Sensitivity to Chemotherapy." *Molecular Medicine Reports* 11 (2):1037–42. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2808>.
- Yang, James Chih-Hsin, Yi-Long Wu, Martin Schuler, Martin Sebastian, Sanjay Papat, Nobuyuki Yamamoto, Caicun Zhou, et al. 2015. "Afatinib versus Cisplatin-Based Chemotherapy for EGFR Mutation-Positive Lung Adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): Analysis of Overall Survival Data from Two Randomised, Phase 3 Trials." *The Lancet. Oncology* 16 (2):141–51. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71173-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71173-8).
- Yano, Seiji, Wei Wang, Qi Li, Kunio Matsumoto, Haruko Sakurama, Takahiro Nakamura, Hirokazu Ogino, et al. 2008. "Hepatocyte Growth Factor Induces Gefitinib Resistance of Lung Adenocarcinoma with Epidermal Growth Factor Receptor-Activating Mutations." *Cancer Research* 68 (22):9479–87. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1643>.
- Yano, Seiji, Tadaaki Yamada, Shinji Takeuchi, Keisei Tachibana, Yuko Minami, Yasushi Yatabe, Tetsuya Mitsudomi, 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 (12):2011–17. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31823ab0dd>.
- Yarden, Y., and M. X. Sliwkowski. 2001. "Untangling the ErbB Signalling Network." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (2):127–37. <https://doi.org/10.1038/35052073>.
- Yarden, Yosef, and Gur Pines. 2012. "The ERBB Network: At Last, Cancer Therapy Meets Systems Biology." *Nature Reviews. Cancer* 12 (8):553–63. <https://doi.org/10.1038/nrc3309>.
- Yeh, Iwei, Thomas Botton, Eric Talevich, A. Hunter Shain, Alyssa J. Sparatta, Arnaud de la Fouchardiere, Thaddeus W. Mully, et al. 2015. "Activating MET Kinase Rearrangements in Melanoma and Spitz Tumours." *Nature Communications* 6 (May):7174. <https://doi.org/10.1038/ncomms8174>.
- Yoshimura, Katsuhiko, Naoki Inui, Masato Karayama, Yusuke Inoue, Noriyuki Enomoto, Tomoyuki Fujisawa, Yutaro Nakamura, Kengo Takeuchi, Haruhiko Sugimura, and Takafumi Suda. 2017. "Successful Crizotinib Monotherapy in EGFR-Mutant Lung Adenocarcinoma with Acquired MET Amplification after Erlotinib Therapy." *Respiratory Medicine Case Reports* 20:160–63. <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2017.02.009>.
- Yoshioka, Toshiaki, Javier Otero, Yu Chen, Young-Mi Kim, Jason A. Koutcher, Jaya Satagopan, Victor Reuter, et al. 2013. "β4 Integrin Signaling Induces Expansion of Prostate Tumor Progenitors." *The Journal of Clinical Investigation* 123 (2):682–99. <https://doi.org/10.1172/JCI60720>.
- Youles, Mark, Oliver Holmes, Maxim V. Petoukhov, Merel A. Nessen, Simona Stivala, Dmitri I. Svergun, and Ermanno Gherardi. 2008. "Engineering the NK1 Fragment of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor as a MET Receptor Antagonist." *Journal of Molecular Biology* 377 (3):616–22. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.01.034>.
- Yu, Helena A., Maria E. Arcila, Natasha Rekhtman, Camelia S. Sima, Maureen F. Zakowski, William Pao, Mark G. Kris, Vincent A. Miller, Marc Ladanyi, and Gregory J. Riely. 2013. "Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers." *Clinical Cancer Research: An Official*

Journal of the American Association for Cancer Research 19 (8):2240–47. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2246>.

Yu, Wei, Lucy E. O'Brien, Fei Wang, Henry Bourne, Keith E. Mostov, and Mirjam M. P. Zegers. 2003. "Hepatocyte Growth Factor Switches Orientation of Polarity and Mode of Movement during Morphogenesis of Multicellular Epithelial Structures." *Molecular Biology of the Cell* 14 (2):748–63. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-06-0350>.

Zeng, Qinghua, Shaoqiong Chen, Zongbing You, Fan Yang, Thomas E. Carey, Daniel Saims, and Cun-Yu Wang. 2002. "Hepatocyte Growth Factor Inhibits Anoikis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells by Activation of ERK and Akt Signaling Independent of NFkappa B." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (28):25203–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201598200>.

Zhang, Xu-chao, Jingchuan Zhang, Ming Li, Xiao-sui Huang, Xue-ning Yang, Wen-zhao Zhong, Liang Xie, et al. 2013. "Establishment of Patient-Derived Non-Small Cell Lung Cancer Xenograft Models with Genetic Aberrations within EGFR, KRAS and FGFR1: Useful Tools for Preclinical Studies of Targeted Therapies." *Journal of Translational Medicine* 11:168. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-168>.

Zhang, Yan, WeiYa Wang, Yan Wang, Yong Xu, Ye Tian, MeiJuan Huang, and You Lu. 2016. "Response to Crizotinib Observed in Lung Adenocarcinoma with MET Copy Number Gain but without a High-Level MET/CEP7 Ratio, MET Overexpression, or Exon 14 Splicing Mutations." *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 11 (5):e59-62. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2015.12.102>.

Zhang, Yanni, Zhiqiang Du, and Mingqiang Zhang. 2016. "Biomarker Development in MET-Targeted Therapy." *Oncotarget* 7 (24):37370–89. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8276>.

Zhang, Ying, Kaitlyn E. Farenholtz, Yanzhi Yang, Fadila Guessous, Charles G. Dipierro, Valerie S. Calvert, Jianghong Deng, et al. 2013. "Hepatocyte Growth Factor Sensitizes Brain Tumors to c-MET Kinase Inhibition." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (6):1433–44. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2832>.

Zhang, Ying, David Schiff, Deric Park, and Roger Abounader. 2014. "MicroRNA-608 and microRNA-34a Regulate Chordoma Malignancy by Targeting EGFR, Bcl-xL and MET." *PLoS One* 9 (3):e91546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091546>.

Zhang, Yu-Wen, Ben Staal, Curt Essenburg, Yanli Su, Liang Kang, Rich West, Dafna Kaufman, et al. 2010. "MET Kinase Inhibitor SGX523 Synergizes with Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Erlotinib in a Hepatocyte Growth Factor-Dependent Fashion to Suppress Carcinoma Growth." *Cancer Research* 70 (17):6880–90. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0898>.

Zhang, Zhenfeng, Jae Cheol Lee, Luping Lin, Victor Olivas, Valerie Au, Thomas LaFramboise, Mohamed Abdel-Rahman, et al. 2012. "Activation of the AXL Kinase Causes Resistance to EGFR-Targeted Therapy in Lung Cancer." *Nature Genetics* 44 (8):852–60. <https://doi.org/10.1038/ng.2330>.

Zhao, Xiaojun, Barbara A. Weir, Thomas LaFramboise, Ming Lin, Rameen Beroukhim, Levi Garraway, Javad Beheshti, et al. 2005. "Homozygous Deletions and Chromosome Amplifications in Human Lung Carcinomas Revealed by Single Nucleotide Polymorphism

Array Analysis." *Cancer Research* 65 (13):5561–70. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4603>.

Zhou, Caicun, Yi-Long Wu, Gongyan Chen, Jifeng Feng, Xiao-Qing Liu, Changli Wang, Shucai Zhang, et al. 2011. "Erlotinib versus Chemotherapy as First-Line Treatment for Patients with Advanced EGFR Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): A Multicentre, Open-Label, Randomised, Phase 3 Study." *The Lancet. Oncology* 12 (8):735–42. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70184-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70184-X).

Zhou, Dong, Roderick J. Tan, Lin Lin, Lili Zhou, and Youhua Liu. 2013. "Activation of Hepatocyte Growth Factor Receptor, c-Met, in Renal Tubules Is Required for Renoprotection after Acute Kidney Injury." *Kidney International* 84 (3):509–20. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.102>.

Zhou, M. M., K. S. Ravichandran, E. F. Olejniczak, A. M. Petros, R. P. Meadows, M. Sattler, J. E. Harlan, W. S. Wade, S. J. Burakoff, and S. W. Fesik. 1995. "Structure and Ligand Recognition of the Phosphotyrosine Binding Domain of Shc." *Nature* 378 (6557):584–92. <https://doi.org/10.1038/378584a0>.

Zhou, Wenjun, Dalia Ercan, Liang Chen, Cai-Hong Yun, Danan Li, Marzia Capelletti, Alexis B. Cortot, et al. 2009. "Novel Mutant-Selective EGFR Kinase Inhibitors against EGFR T790M." *Nature* 462 (7276):1070–74. <https://doi.org/10.1038/nature08622>.

Zhu, H., M. A. Naujokas, E. D. Fixman, K. Torossian, and M. Park. 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 (47):29943–48.

Zou, Chunbin, Jihong Ma, Xue Wang, Lida Guo, Zhenqi Zhu, John Stoops, Amanda E. Eaker, et al. 2007. "Lack of Fas Antagonism by Met in Human Fatty Liver Disease." *Nature Medicine* 13 (9):1078–85. <https://doi.org/10.1038/nm1625>.

Résumé

Titre : Conséquences de la dérégulation de MET sur le phénotype des cancers bronchiques non à petites cellules EGFR mutés devenus résistants aux inhibiteurs de tyrosine kinase d'EGFR

Introduction : Le traitement des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) EGFR mutés repose sur les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) du récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGFR). Cependant tous les patients traités par ITK EGFR finissent par présenter une progression tumorale, du fait de mécanismes de résistance comme l'amplification du gène codant pour le récepteur tyrosine kinase MET. Il n'existe actuellement aucune donnée sur les modifications phénotypiques induites par l'activation de MET dans ce contexte. L'objectif de cette thèse est de déterminer si l'amplification de *MET*, lors de la résistance aux ITK EGFR dans les CBNPC EGFR mutés, confère aux cellules tumorales un phénotype plus agressif et modifie l'histoire naturelle de la maladie.

Méthodes : Les capacités de prolifération, de croissance sans ancrage, de formation de sphéroïdes, de résistance à l'anoïkis et de migration ont été étudiées *in vitro* dans la lignée HCC827, dérivée d'un CBNPC EGFR muté, et dans sa lignée fille HCC827-GR6 (GR6) devenue résistante aux ITK EGFR *via* une amplification du gène *MET*. L'expression de la vimentine, de ZEB1, et de la E-cadherine a également été étudiée dans les deux lignées cellulaires afin d'évaluer l'impact de l'amplification de MET sur la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). *In vivo* la croissance tumorale et le potentiel métastatique ont respectivement été analysés dans des modèles murins de xélogreffe ectopique et d'injection intracardiaque. Enfin les données cliniques de patients issus de 15 centres avec un CBNPC EGFR muté métastatique, présentant une forte surexpression de MET en immunohistochimie (score 3+) ou une amplification de *MET* en FISH sur une re-biopsie réalisée après la progression sous ITK EGFR ont été analysées rétrospectivement.

Résultats : *In vitro*, l'amplification de *MET* induisait une augmentation significative de la prolifération, de la croissance sans ancrage, de la formation de sphéroïdes, de la résistance à l'anoïkis et de la migration. En présence d'un inhibiteur de MET, le PHA-665752, ces différentes propriétés biologiques étaient réduites de façon significative dans les cellules GR6 porteuses de l'amplification de *MET*. Il était également mis en évidence dans les cellules GR6 une augmentation de l'expression de la vimentine et de ZEB1. *In vivo*, l'amplification de *MET* augmentait significativement la croissance tumorale et le potentiel métastatique. Un traitement par crizotinib, ITK ciblant MET, diminuait de façon significative le potentiel métastatique des cellules porteuses de l'amplification de *MET*. Enfin les patients atteints d'un CBNPC EGFR muté, porteur d'une amplification de *MET* à la résistance à l'ITK EGFR, présentaient une durée jusqu'à apparition de nouvelles métastases plus courte après progression sous ITK EGFR que les patients avec une forte surexpression de MET sans amplification génique.

Conclusion : L'amplification de *MET* dans un contexte de résistance aux ITK EGFR est associée à un phénotype tumoral plus agressif. Ces résultats plaident en faveur d'une utilisation précoce d'inhibiteurs de MET en association avec les ITK EGFR afin d'éviter l'émergence d'un clone tumoral résistant plus agressif.

Mots clefs : EGFR, MET, inhibiteur de tyrosine kinase, cancer bronchique non à petites cellules