

Université des Sciences et Technologies de Lille

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université en Sciences de la Vie et de la Santé

Par

Julien DEHEUNINCK

Le récepteur MET, une cible fonctionnelle des caspases

Soutenue le 03 novembre 2006

Devant le jury composé de :

Président : Pr Hubert HONDERMARCK

Rapporteurs : Dr Flavio MAINA

Dr Pascale CREPIEUX

Directeur de thèse : Dr Véronique FAFEUR

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à témoigner de ma reconnaissance à tous les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail. Je remercie le Pr Hubert Hondermarck d'avoir accepté de présider le jury, ainsi que les Dr Flavio Maina et Pascale Crepieux, d'avoir accepté la fonction de rapporteur, qui demande beaucoup de travail et de temps.

Merci au Dr Bernard Vandebunder de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de même qu'au Pr Yvan de Launoit pour ses conseils avisés et précieux.

Je remercie tout particulièrement le Dr Véronique Fafeur pour m'avoir encadré pendant ces cinq dernières années. Je sais tout ce que je vous dois, tant au niveau scientifique qu'au niveau financier, pour cette thèse réalisée dans la douleur certes, mais qui finalement est parvenue à son terme dans d'excellentes conditions. Malgré les doutes et les problèmes que j'ai vécus, j'ai apprécié votre détermination à toujours rechercher des solutions, et si ma carrière scientifique a démarré, c'est uniquement grâce à vous.

Un grand merci également à David Tulasne, qui m'a appris tellement de choses. Nos discussions scientifiques ont été extrêmement intéressantes, et j'espère vivement continuer à interagir de la sorte avec Mr « Une hypothèse à la minute ». Nos vies se ressemblent, sauf que tu as quelques années d'avance. J'espère réussir le même parcours que le tien, que je prends pour exemple.

Un énorme merci à Catherine Leroy, ITA de choc et de charme, dont les qualités sont innombrables, et qui est surtout un exemple de détermination et de volonté. Je te souhaite le meilleur dans tous les domaines, car tu le mérites amplement. J'ai apprécié chaque jour ta compagnie, même les jours où ton mauvais caractère prenait le dessus, et surtout tu m'as énormément apporté pour réussir cette période cruciale et difficile qu'est le doctorat.

Je tiens à remercier tous les membres du groupes IECE, Bénédicte Foveau, dont j'apprécie énormément la gentillesse, la rigueur et la disponibilité, Zongling Ji, qui m'a permis de perfectionner mon anglais, et qui a été toujours adorable avec moi, Frédéric Ancot,

que je félicite pour sa bourse et je lui souhaite de faire du bon travail, ce dont je ne doute pas, Réjane Paumelle et Sylvie Reveneau, toujours prévenantes et gentilles, mais également Sébastien pour nos fous-rires en salle culture, Alessandro pour ses bonbons et parce qu'enfin quelqu'un qui parle de foot dans ce labo, Chantal pour ses conseils techniques avisés, Fatima pour ses thés à la menthe et enfin Corinne et Albin pour leurs conseils scientifiques. Merci infiniment à tous les occupants de l'étage qui ont fait partie de cette période formidable de ma vie.

Evidemment, je terminerai ces remerciements par ceux sans qui je ne serai rien. Mes parents, d'abord, pour leur soutien inconditionnel et sans faille, que je remercie de croire toujours en moi et de m'avoir donné les moyens de choisir ma voie et de m'y épanouir.

Mon épouse que je remercie du fond du cœur de me soutenir toujours autant. Je sais que je ne suis pas facile à vivre et que mon ambition professionnelle nous pousse à faire des sacrifices importants. Tu es toujours là pour me pousser vers le haut avec tout l'altruisme qui te caractérise. Tu es une femme exceptionnelle, une épouse formidable, une maman remplie d'amour et une institutrice de très grande qualité. Merci pour tout ce que tu me donnes et que tu me donneras encore.

Merci à la plus belle réussite de ma vie, mon fils Lucas, qui éclaire de sa présence mes journées. Puisses-tu avoir un avenir radieux et je te promets de tout faire pour que tu t'épanouisses dans ta vie future. Tu me donnes tellement de bonheur chaque jour que tu mérites tous les sacrifices. En espérant t'offrir bientôt un petit frère ou une petite sœur pour grandir ensemble.

Merci enfin à tous ceux qui remplissent ma vie, et même si je ne les vois pas souvent, ou que je ne donne pas toujours de nouvelles, sont très chers à mon cœur : Sophie, Fred, Emma et Adam, que j'aime tendrement, mes beaux-parents, car ils acceptent tellement de choses, Pilou, qui mérite tellement mieux que ce qu'il a, mes grand-mères, mon parrain, ma marraine, ma belle-sœur et sa petite famille, merci pour tout.

Merci également à tous mes amis qui m'ont soutenu et encouragé, Cédric et Anaïck, Peter et Aurélie, Fabienne et Fred, Christelle et Fred, Ben et Marie, et tous les autres. Je leur souhaite pleins de bonnes choses.

Merci aussi à ceux que je n'ai pas nommés, nul n'est parfait !

Si je suis arrivé là, c'est grâce à vous tous. Merci.

Résumé

L'*hepatocyte growth factor/scatter factor* (HGF/SF) est le ligand du récepteur tyrosine kinase MET, qui favorise les capacités de survie, prolifération, motilité et morphogénèse des cellules épithéliales. La signalisation de l'HGF/SF-MET est essentielle au cours du développement et sa dérégulation peut conduire au développement tumoral et à la progression métastatique. La surexpression du récepteur et/ou du ligand est associée à de nombreux cancers et est souvent corrélée à un mauvais pronostic. De plus, un lien causatif entre MET et le cancer est établi depuis l'identification de mutations activatrices de MET dans le cancer papillaire rénal héréditaire.

L'activation du récepteur MET par l'HGF/SF est classiquement associée à la survie cellulaire, en réponse à des stress variés. Cependant, nos travaux nous ont amené à montrer qu'en absence d'HGF/SF, ces mêmes stress peuvent convertir le récepteur MET en facteur pro-apoptotique. En effet, nous avons montré que le récepteur est clivé par les caspases dans sa région juxtamembranaire, permettant la génération de deux fragments fonctionnels : un fragment transmembranaire, p100 MET, correspondant à un récepteur-leurre, et un fragment p40 MET, cytosolique, possédant des capacités pro-apoptotiques. Nous avons également montré que le clivage juxtamembranaire est régulé négativement par l'activation du récepteur, par la phosphorylation d'un résidu tyrosine juxtaposé au site de clivage par les caspases.

Ces travaux révèlent que MET est une cible fonctionnelle des caspases et mettent en évidence que l'HGF/SF et MET participent à la balance survie/apoptose.

Abstract

Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is the ligand of the MET tyrosine kinase receptor and induces survival, proliferation, motility or morphogenesis in epithelial cells. HGF/SF-MET signaling is essential in embryonic development and its deregulation contributes to tumor development and metastatic progression. The ligand and/or receptor overexpression is associated to numerous cancers and is often correlated to bad prognostic. Moreover, a direct link between MET and cancer have been provided by identification of activating mutation in the MET sequence associated with hereditary papillary renal cancer.

MET activation by HGF/SF is classically associated to cell survival after various stresses. However, our work provides evidence that in the absence of HGF/SF, these stresses can convert MET receptor to a pro-apoptotic factor. We demonstrated that the receptor is cleaved by caspases within its juxtamembrane region, allowing generation of two functional fragments: a transmembrane fragment, p100 MET, corresponding to a decoy receptor, and a cytosolic fragment, p40 MET, possessing pro-apoptotic capacities. We also demonstrated that the juxtamembrane caspase cleavage of MET is negatively regulated by receptor activation, by the phosphorylation of a tyrosine residue neighboring the cleavage site.

These results demonstrate that MET receptor is a functional target of caspases, and highlight HGF/SF-MET involvement in the apoptosis/survival balance.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	5
I. MET et HGF/SF	5
1. Origines	5
a. L' "Hepatocyte growth factor / Scatter factor"	5
b. Le récepteur tyrosine kinase MET	5
2. Structure et mécanisme d'activation	6
a. L' HGF/SF.....	6
b. MET	7
i La région extracellulaire.....	7
ii Le domaine kinase.....	8
c. Mécanisme d'activation	9
3. Les autres domaines de régulation	13
a. La région juxtamembranaire	13
b. La région C-terminale	14
4. Les activités biologiques du couple HGF/SF-MET	15
a. En culture cellulaire	15
b. « <i>In vivo</i> »	15
i Au cours du développement.....	15
ii Chez l'adulte	16
5. MET-HGF/SF et Cancer	17
a. Données générales sur l'incidence des cancers en France	17
b. HGF/MET & Cancer	18

i	Perte de la régulation de l'HGF/SF	19
ii	Perte de la régulation de MET.....	19
c.	Thérapies anticancéreuses ciblées sur MET.....	21
i	Inhibiteurs de la fixation de l'HGF/SF sur MET	22
ii	Inhibiteurs de l'activité kinase	22
iii	Inhibiteurs de l'activation des voies en aval de MET	23
6.	MET et HGF/SF n'agissent pas seuls	25
a.	Les partenaires de l'HGF/SF.....	25
i	Les glycoaminoglycanes	25
ii	La nucléoline	26
b.	Les partenaires extra-cellulaires de MET.....	26
i	Les sémaphorines et les plexines	26
ii	CD44	27
iii	L' internaline B	28
c.	Les récepteurs partenaires de MET.....	29
i	RON : le plus proche parent de MET.....	30
ii	Le récepteur à l'EGF.	30
iii	Fas, le récepteur de mort	31
iv	Intégrine $\alpha 6\beta 4$	31
v	E-cadhérine et β -caténine	32
d.	Les partenaires intracellulaires de MET.....	33
i	Grb2.....	35
ii	Gab1	36
iii	CBL.....	37
iv	PI3K	39

v	Src.....	39
vi	Shc.....	40
vii	PLCγ1	41
viii	STAT3.....	42
ix	FAK.....	42
x	Les protéines tyrosine phosphatase : TC-PTP, LAR, DEP-1 et SHP2.	44
xi	Les autres partenaires directs de MET : RanBPM, Bag-1, SHIP-1, FAP68, DAPK3,	46
xii	Les partenaires indirects majeurs de MET pour sa signalisation.....	48
e.	Voies de signalisation.....	49
i	Les voies de signalisation principales engagées par MET.....	49
ii	Trafic et dégradation du récepteur MET activé.....	50
II.	L'apoptose.....	51
	La mise en place des éléments du puzzle apoptotique.....	52
a.	La fragmentation oligonucléosomique de l'ADN résulte de l'activation de pro-caspases effectrices	52
b.	La cascade d'activation des caspases : les pro-caspases effectrices sont activées par des caspases initiatrices.....	53
c.	Les pro-caspases initiatrices sont capables de s'autoactiver.....	53
d.	L'autoactivation des caspases initiatrices est secondaire à l'engagement des voies apoptotiques extrinsèques et intrinsèques	54
i	Voie apoptotique intrinsèque	54
ii	Voie apoptotique extrinsèque.....	55
	RESULTATS.....	57

I. Article 1 : Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage.....	58
1. Introduction	58
2. Conclusion.....	59
II. Article 2 : Caspase cleavage of the Met tyrosine kinase generates a natural decoy receptor.	60
1. Introduction	60
2. Conclusion.....	61
III. Article 3 : Caspase cleavage of MET is prevented by autophosphorylation within its juxtamembrane region.....	63
1. Introduction	63
2. Conclusion.....	64
DISCUSSION	65
I. Le couple HGF/SF-MET induit la survie.....	65
II. Le récepteur MET est un double substrat des caspases.	67
III. Comment p40 MET induit il l'apoptose ?.....	68
IV. Le récepteur MET peut être clivé par un autre mécanisme... ..	70
V. Le partenaire principal de MET, Gab1, est régulé comme MET	71
1. Par clivage caspase-dépendant	71
2. Par ubiquitinylation	71
CONCLUSION	72
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	73

Introduction

INTRODUCTION

I. MET et HGF/SF

1. Origines

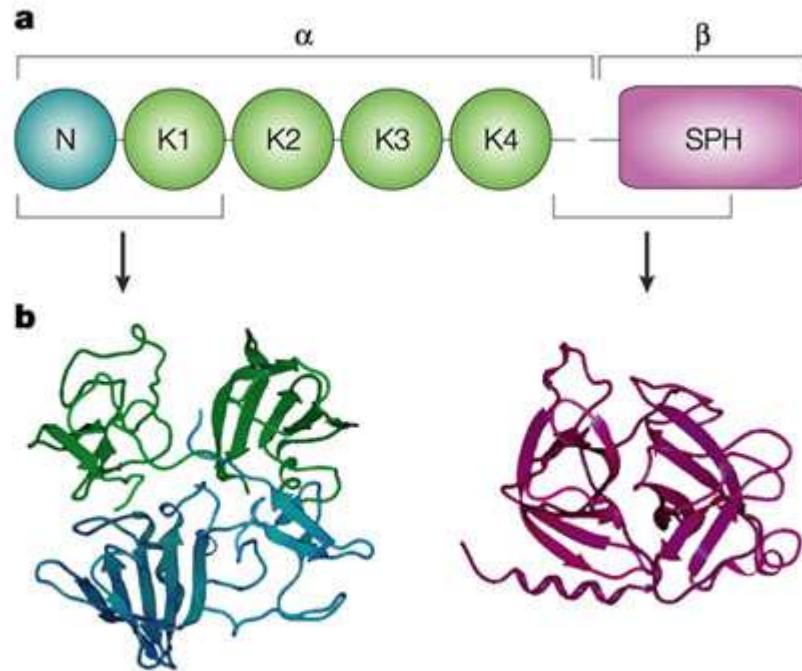
a. L'«Hepatocyte growth factor / Scatter factor»

Un facteur de croissance du sérum capable d'induire une rapide régénération du foie d'animaux préalablement hépatectomisés a été mis en évidence en 1967. En 1984, ce facteur a été isolé et caractérisé comme étant un mitogène pour les hépatocytes en culture, d'où son nom de facteur de croissance pour les hépatocytes (« Hepatocyte Growth Factor », HGF) (Nakamura et al., 1984). Par ailleurs, un facteur sécrété par les fibroblastes capable de stimuler la motilité de cellules épithéliales en culture a été isolé en 1985. Ce facteur est capable de casser les jonctions cellulaires et d'induire la dissociation d'îlots de cellules épithéliales *in vitro* (Stoker, 1989; Stoker et al., 1987; Stoker and Perryman, 1985). Par cette capacité, ce facteur sera baptisé facteur de dispersion (« Scatter Factor », SF) (Stoker and Perryman, 1985).

En 1991, il a été montré que les séquences de l'HGF et du SF sont identiques et que leurs effets biologiques sont interchangeables (Naldini et al., 1991c; Weidner et al., 1991). Dès lors, ce facteur de croissance sera désigné comme l'HGF/SF, appellation qui réunit deux de ses principales activités biologiques et qui honore la double origine de sa découverte.

b. Le récepteur tyrosine kinase MET

La protéine MET a été découverte par Cooper et al. en 1984 sous la forme d'un oncogène activé (TPR-MET) présent dans la lignée HOS, une lignée de cellules dérivées d'un ostéosarcome humain et transformées par un carcinogène chimique (Cooper et al., 1984). La séquence de TPR-MET fut isolée deux années plus tard à partir de fibroblastes NIH3T3 transfectés par de l'ADNc extrait de ces cellules HOS (Park et al., 1986). Sa caractérisation a montré que TPR-MET résulte du réarrangement entre un fragment du chromosome 1 humain



- (a) structure de l'HGF/SF : N= domaine N-terminal; K1-K4= 4 domaines kringle; SPH= domaine sérine protéinase.
 (b) Structure cristallographique de NK1 et du domaine sérine protéinase.

Fig. 1 : Structure schématique de l'HGF/SF

(d'après Birchmeier C. & al., 2003)

Enzyme	Activité spécifique*	Autres substrats connus
HGFA	0.006 µg/mL	aucun
Facteur XIIa	0.7 µg/mL	Facteur XI
MT-SP1/Matriptase	? (>0.5 µg/mL) [°]	Pro-uPA, PAR2, laminine, fibronectine, gélatine
uPA	? (>50 µg/mL) [°]	Plasminogène
tPA	? (>50 µg/mL) [°]	Plasminogène

* Concentration requise pour l'activation de 50% de 200 µg/mL de scHGF, à 37°C pendant 2h.

[°] l'activité spécifique n'a pas été rapportée

HGFA : HGF activator; MT-SP1 : membrane-type serine protease-1; uPA : urokinase-type plasminogen activator; tPA : tissue-type plasminogen activator; PAR2 : protease-activated receptor 2.

Tableau 1 : Les enzymes de maturation de l'HGF/SF

(d'après Kataoka H. & al., 2003)

portant un gène jusqu'alors inconnu, le gène TPR (pour « Translocated promoter region ») et un fragment du chromosome 7 (7q21-31) portant une forme tronquée du gène humain c-met (Cooper et al., 1984; Park et al., 1986; Park et al., 1987).

En 1991, deux équipes distinctes montrent que l'HGF/SF induit la phosphorylation de la sous-unité β du récepteur tyrosine kinase MET, suggérant que l'HGF/SF est le ligand du récepteur MET (Bottaro et al., 1991; Naldini et al., 1991b). Des études de liaison montrent que MET est un récepteur de haute affinité pour l'HGF/SF (Bottaro et al., 1991; Naldini et al., 1991a; Naldini et al., 1991b).

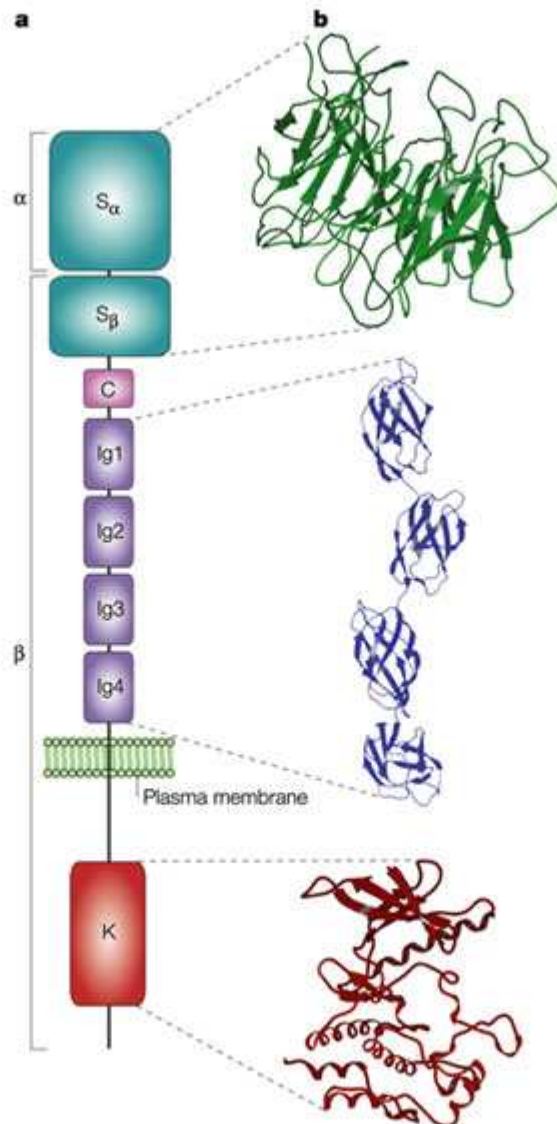
Le récepteur MET fait partie de la grande famille des récepteurs tyrosine kinase. Au sein du génome humain, 90 gènes codant des tyrosine kinases ont été recensés, 58 de type « récepteurs » car possédant un domaine transmembranaire, séparables en 20 familles, et 32 de type « non-récepteur », séparables en 10 familles (Robinson et al., 2000). Notons que les tyrosine kinases, ainsi que leurs pendants, les tyrosine phosphatases, n'existent pas chez les organismes unicellulaires, mais apparaissent dès les premiers métazoaires. Ils pourraient ainsi être impliqués dans la communication entre cellules, alors que les serine-thréonine kinases, qui sont largement répandues chez les protozoaires, auraient plus un rôle de fonctionnement intrinsèque à chaque cellule.

2. Structure et mécanisme d'activation

a. L' HGF/SF

L'HGF/SF est un facteur de croissance apparenté au plasminogène, en compagnie du MSP (Macrophage stimulating protein), le ligand du récepteur RON. Il est composé d'une sous-unité α de 69 kDa et d'une sous-unité β de 34 kDa (Nakamura, 1991) (Fig. 1). Ces deux sous-unités dérivent d'un précurseur commun, qui est mûri par clivage protéolytique pour former la molécule active. L'HGF/SF est constitué de 6 domaines : un domaine N-terminal (N), suivi de 4 copies d'un domaine kringle (K1-K4), et un domaine C-terminal (SP) apparenté structurellement au domaine catalytique de sérine protéinases de la famille de la chymotrypsine, mais dépourvu d'activité enzymatique. Le domaine SP constitue à lui seul la chaîne β , la sous-unité α couvrant la région N-terminale et les 4 domaines kringle.

L'HGF/SF est une glycoprotéine sécrétée principalement par les cellules mésenchymateuses sous une forme de précurseur inactif à une chaîne (scHGF pour single-



- (a) structure du récepteur MET : S= domaine SEMA; C= domaine riche en cystéine (=PSI); Ig= domaine homologue aux immunoglobulines (=IPT); K= domaine kinase; α et β représentent les sous-unités du récepteur après maturation.
- (b) Structure cristallographique du domaine SEMA, du domaine homologue aux immunoglobulines et du domaine kinase.

Fig. 2 : Structure globale du récepteur MET

(d'après Birchmeier C. & al., 2003)

chain HGF). Le précurseur de l'HGF/SF demeure inactif probablement associé avec des protéoglycanes de la matrice extra-cellulaire dans les tissus le produisant. Pour créer l'HGF/SF biologiquement actif, le scHGF va subir un clivage protéolytique unique entre l'Arg⁴⁹⁴ et la Val⁴⁹⁵, pour générer la forme active à deux chaînes (tcHGF pour two-chain HGF) (Gak et al., 1992; Naka et al., 1992; Naldini et al., 1992). Cinq protéases ont été décrites pour être capables d'activer l'HGF/SF, avec des activités spécifiques différentes (Tableau 1). Le plus efficace, l'HGFA (HGF activator) est un membre de la famille des kringle-sérine protéinases, et ressemble au niveau de sa structure au facteur de coagulation XII (Miyazawa et al., 1993). Il est synthétisé au niveau de nombreux tissus normaux, mais des cellules tumorales d'origine variées expriment et sécrètent l'HGFA, suggérant un rôle potentiel de cette enzyme dans l'évolution d'une tumeur (Kataoka et al., 2003). L'HGFA est synthétisé et sécrété également sous une forme inactive, dont l'activation est réalisée par la thrombine (Shimomura et al., 1993).

b. MET

Le gène c-met code un récepteur possédant une activité catalytique tyrosine kinase (Park et al., 1987). Après traduction, un précurseur d'environ 170 kDa de la protéine MET subit une maturation au cours de laquelle le domaine extracellulaire est d'abord glycosylé, puis clivé en une sous-unité α de 50 kDa et une sous-unité β de 140 kDa, qui restent associées par des ponts disulfures. Alors que la sous-unité α est exclusivement extracellulaire, la sous-unité β est composée d'une région extracellulaire, un domaine transmembranaire nécessaire à l'ancrage du récepteur à la membrane plasmique, et une région intracellulaire portant l'activité tyrosine kinase (Fig. 2)

i La région extracellulaire

Elle est constituée de l'intégralité de la sous-unité α , et de la région N-terminale de la sous-unité β , séparée après maturation du récepteur par un clivage entre l'Arg³⁰⁷ et la Ser³⁰⁸ réalisé par la furine (Komada et al., 1993). La région extracellulaire du récepteur contient 2/3 de la protéine (932 acides aminés sur 1390) et peut être séparée en différents domaines. Les 500 premiers résidus N-terminaux se structurent en domaine SEMA, qui possède des

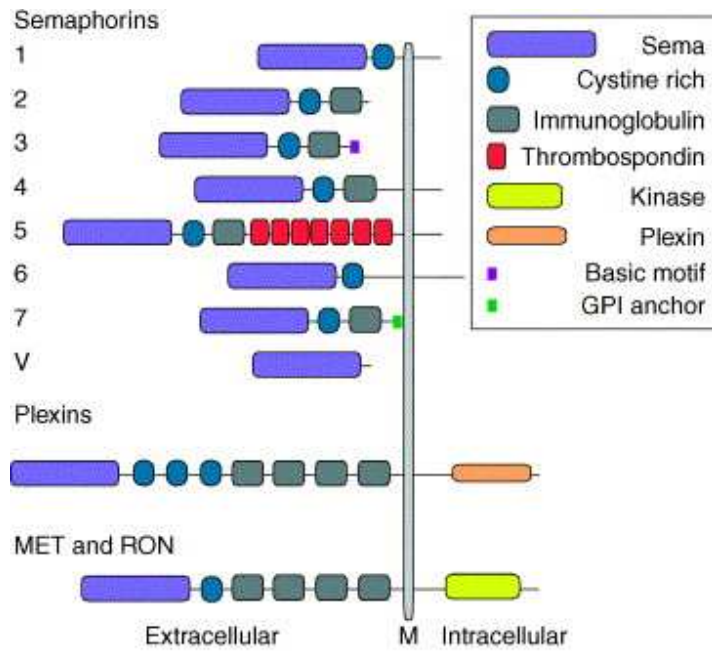
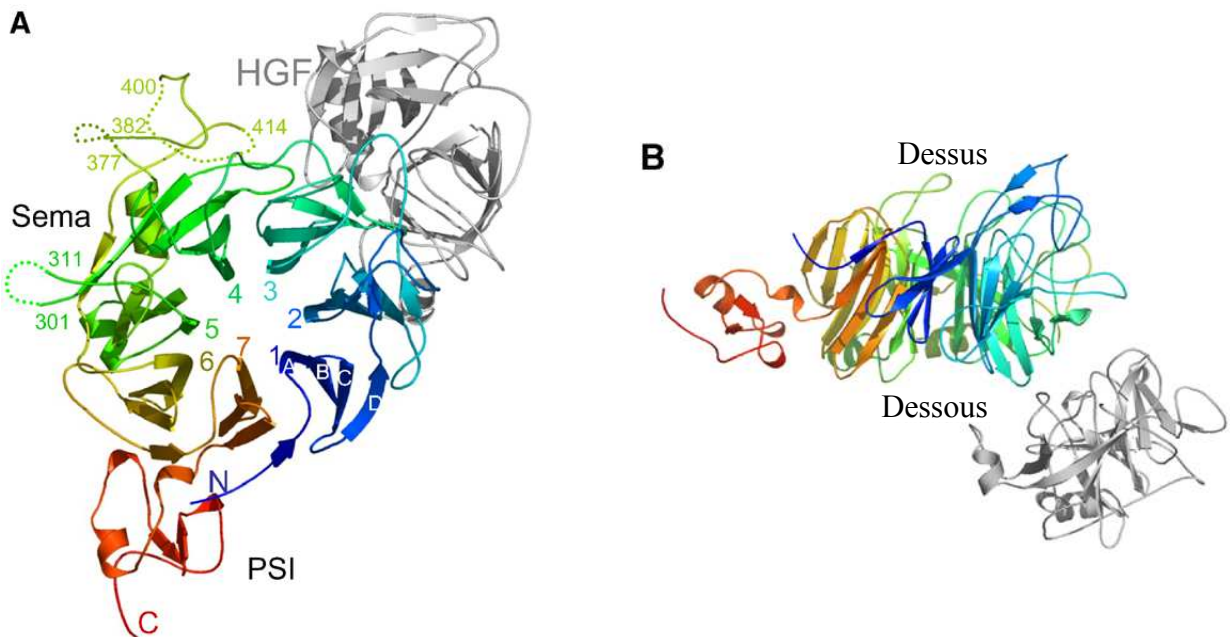


Fig. 3 : Architecture des domaines des sémaphorines, plexines, MET et RON

(d'après Gerardi E. & al., 2004)



Représentation en rubans de la chaîne β de l'HGF/SF (en gris) et des domaines SEMA et PSI de MET (en couleur).

(A) Vue du dessus

(B) Vue de côté

Fig. 4 : Complexe entre les domaines SEMA et PSI de MET et la chaîne β de l'HGF/SF

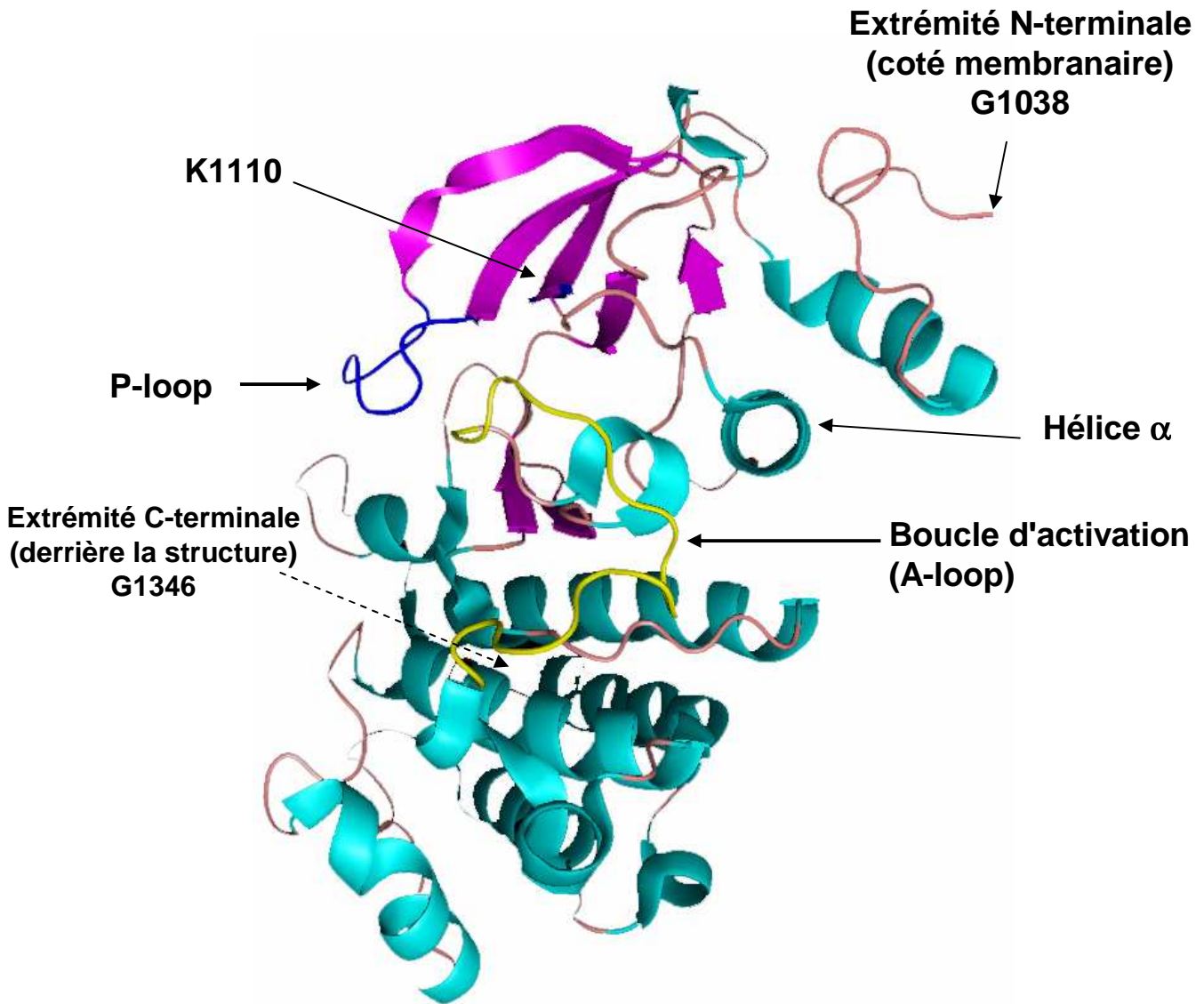
(d'après Stamos J. & al., 2004)

homologies de séquence avec des domaines retrouvés dans les sémaphorines et les plexines (Winberg et al., 1998), immédiatement suivi d'un domaine riche en cystéines, baptisé PSI car commun aux plexines, semaphorines et intégrines (Gherardi et al., 2004) (Fig. 3). Les plexines et les sémaphorines font partie d'une grande famille de protéines secrétées ou associées à la membrane d'abord décrites pour leur rôle dans le développement neuronal (Van Vactor and Lorenz, 1999).

La structure cristallographique du domaine SEMA est connue, il forme une structure à 7 pales d'hélice composées de 4 feuillets β (Gherardi et al., 2003; Stamos et al., 2004) (Fig. 4). Il possède un diamètre de plus de 50 Å, dont la forme générale ressemble à un entonnoir dont le diamètre intérieur serait d'environ 25 Å entre les atomes de la chaîne principale à l'endroit le plus éloigné, et 10 Å pour la partie la plus proche. Les 7 pales de l'hélice sont constituées de 4 feuillets β antiparallèles (de A au centre à D à l'extérieur), arrangés en une forme circulaire. Le feuillet N-terminal correspondant au feuillet D de la dernière pale vient fermer l'hélice et stabiliser la structure générale (Fig. 4). Le dernier feuillet est immédiatement suivi du domaine PSI, qui a des dimensions d'environ 20 x 15 Å, et qui est un module structural indépendant du domaine SEMA dont la structure est également connue. Le noyau de ce domaine est formé de deux hélices et de trois petits feuillets β antiparallèles. Il a été suggéré que ce domaine pourrait fonctionner comme un module de lien pour orienter correctement le domaine SEMA et permettre une fixation correcte du ligand (Kozlov et al., 2004). Les domaines SEMA et PSI sont suivis de la répétition 4 domaines homologues aux immunoglobulines, baptisés IPT pour région homologue aux Immunoglobulines, trouvés dans les Plexines et les facteurs de Transcription. Il s'agit de répétitions de 22-23 acides aminés riches en proline et glycine séparés par des séquences de 84 à 91 acides aminés, prédits pour former des structures secondaires avec des motifs conservés de feuillets β (Gherardi et al., 2003). Cette région apparaît comme une tige qui donne une forme asymétrique et allongée au domaine extra-cellulaire de MET (Fig. 2).

ii Le domaine kinase

Le domaine kinase de MET suit l'architecture classique des protéines kinases, à savoir une structure bilobée, avec côté N-terminal un domaine contenant de nombreux feuillets β lié par une articulation à un lobe d'hélice α côté C-terminal. (Fig. 5). Le domaine kinase de MET



Structure cristallographique de la forme auto-inhibée du domaine kinase de MET (G1038 à G1346).

En jaune : boucle d'activation

En bleu : P-loop (zone nécessaire à la fixation de l'ATP)

K1110 : Résidu qui stabilise la fixation de l'ATP

En vert : les hélices

En mauve : les feuillets β

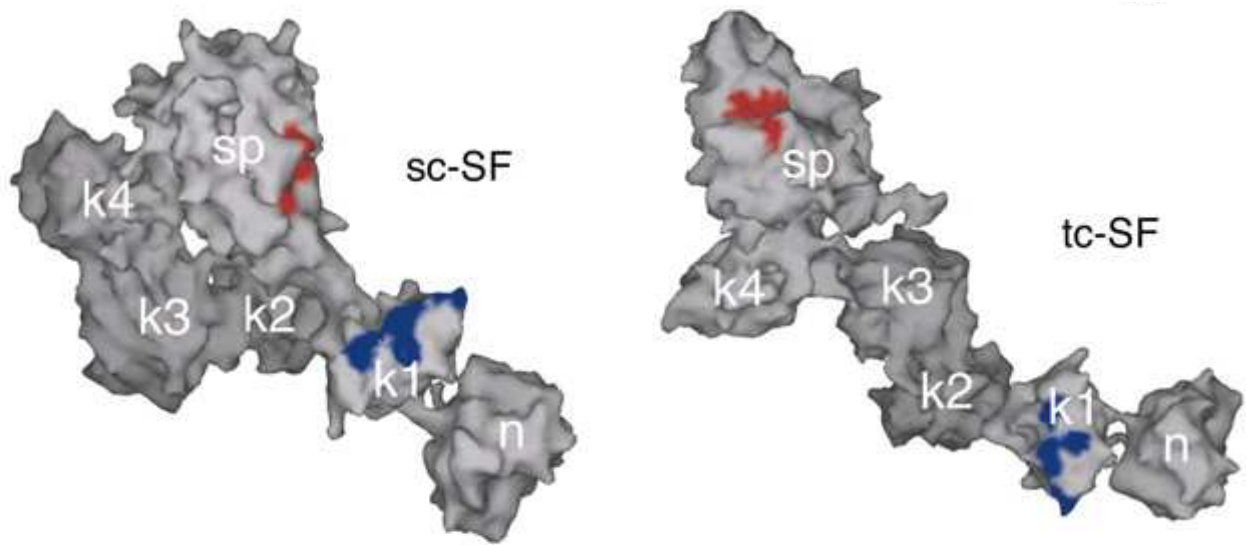
Fig. 5 : Structure du domaine kinase de MET

(d'après Wang W. & al., 2006)

possède une identité de séquence d'environ 40% avec le domaine kinase du récepteur à l'insuline, et du récepteur au FGF, avec lesquels la structure se superpose avec un haut degré de chevauchement. Une première structure du domaine a été établie par cristallographie, en cocrystal avec un inhibiteur de MET, analogue de la staurosporine, nommé K252a (Schiering et al., 2003). Pour obtenir cette structure, les auteurs ont dû muter trois tyrosines importantes pour l'activation du récepteur, la tyrosine Y1196 (Y6) et la tyrosine Y1234 (Y8) en phénylalanine, et la Y1235 (Y9) en acide aspartique, pour obtenir une forme active de la kinase. Une autre structure du domaine kinase de MET a été réalisée en coexprimant le domaine kinase de MET avec la tyrosine phosphatase PTP1B, afin de cristalliser une forme entièrement déphosphorylée du récepteur, sans nécessiter de mutation (Fig.5) (Wang et al., 2006). Ces deux structures permettent de mieux comprendre comment la kinase est autoinhibée, et comment les phosphorylations cruciales des résidus Y8 et Y9 vont déstabiliser cette forme autoinhibée, par comparaison entre la structure de la forme active et de la forme inactive. La structure de la forme inactive permet de visualiser les interactions faibles entre la P-loop (en bleu, Fig. 5), nécessaire à la fixation de l'ATP (résidus 1084 à 1092), la Lys¹¹¹⁰ qui stabilise la fixation de l'ATP phosphate, la boucle d'activation (en jaune, Fig. 5), qui contient les résidus Y8 et Y9, essentiels à l'activation du récepteur, et enfin l'hélice α , qui stabilise le tout. La phosphorylation de la Y9, suivie de la phosphorylation de sa voisine la Y8, induit la levée de l'autoinhibition de la kinase, et la rend active. Cette activation permet la phosphorylation des autres tyrosines du récepteur nécessaire au recrutement de partenaires, localisés dans la région juxtamembranaire et dans la région C-terminale. La levée d'autoinhibition de la kinase est réalisée par la dimérisation de deux récepteurs, médiées par l'interaction du ligand dans la région extracellulaire. Je vais maintenant détailler le mécanisme d'activation du récepteur MET en utilisant les connaissances structurales des domaines du récepteur MET et de l'HGF/SF.

c. Mécanisme d'activation

Il existe au minimum deux modèles de dimérisation pour les récepteurs. Le premier impliquerait deux récepteurs pour une seule molécule de ligand. Ceci nécessiterait deux sites de fixation séparés et non-équivalents sur une molécule de ligand pour former un complexe de signalisation ligand-récepteur 1:2. Cette stœchiométrie est décrite pour l'hormone de croissance (GH) et son récepteur (de Vos et al., 1992). Le second modèle consisterait en un



Les régions impliqués dans l'interaction avec MET sont en bleu (forte affinité) et rouge (faible affinité).

Structure globale de l'HGF/SF immature (sc-SF) et mature (tc-SF)



Modèle en structure pleine du complexe 1:1 entre la région extra-cellulaire de MET et l'HGF/SF

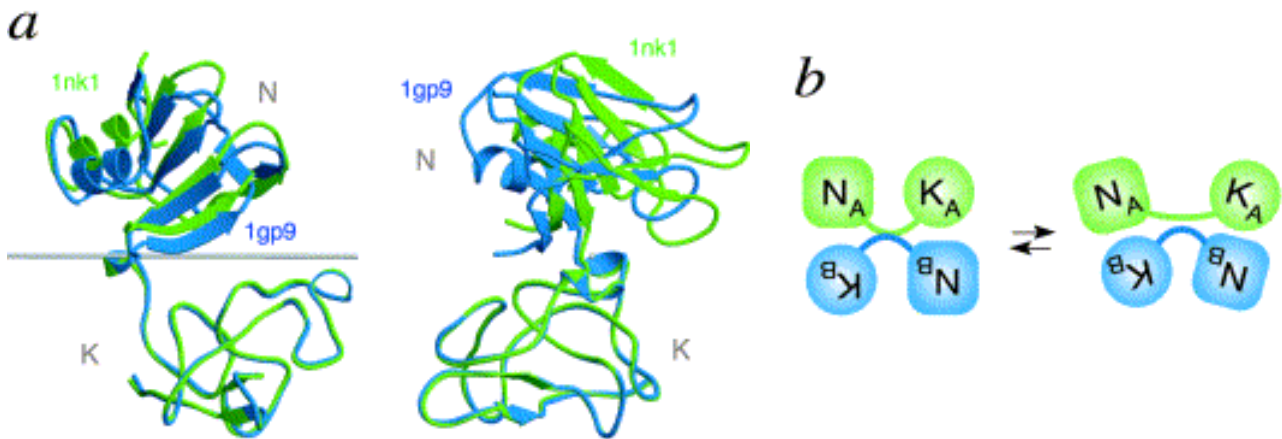
Fig. 6 : Modèle d'interaction entre l'HGF/SF et la région extracellulaire de MET.

(d'après Gherardi E. & al., 2006)

complexe de signalisation 2:2, formé soit de l'association de deux complexes binaires ligand-récepteur 1:1, soit de la dimérisation du ligand précédant l'interaction avec le récepteur.

En ce qui concerne MET et l'HGF/SF, il a été montré que l'interaction et la dimérisation du récepteur nécessitent le domaine SEMA de MET (Kong-Beltran et al., 2004), et qu'il existe deux sites d'affinités différents entre l'HGF/SF et le domaine SEMA de MET. Le premier implique la chaîne α de l'HGF/SF, en particulier les domaines N et K1, et est responsable de l'interaction à haute affinité avec MET ($K_D = 20-30$ pM) (Lokker et al., 1992; Okigaki et al., 1992). La chaîne β est également impliquée dans l'interaction avec le récepteur, mais à une plus faible affinité ($K_D = 90$ nM) (Stamos et al., 2004) (Fig. 6 en haut, zone bleue et rouge). Une structure cristallographique du domaine SEMA avec la chaîne β de l'HGF/SF a permis de montrer qu'elle s'associait au domaine SEMA par la face inférieure de l'hélice, en formant des contacts avec des résidus sortant des pales 2 et 3 (Stamos et al., 2004) (Fig. 4). Des données de tomographie cryo-électronique permettent de visualiser la structure générale de l'HGF/SF et il semble que la région NK1 s'associe également à la structure du domaine SEMA, mais vraisemblablement sur la face supérieure, les domaines K2 à K4 s'arrangeant en ligne le long de la structure (Gherardi et al., 2006) (Fig. 6 en bas).

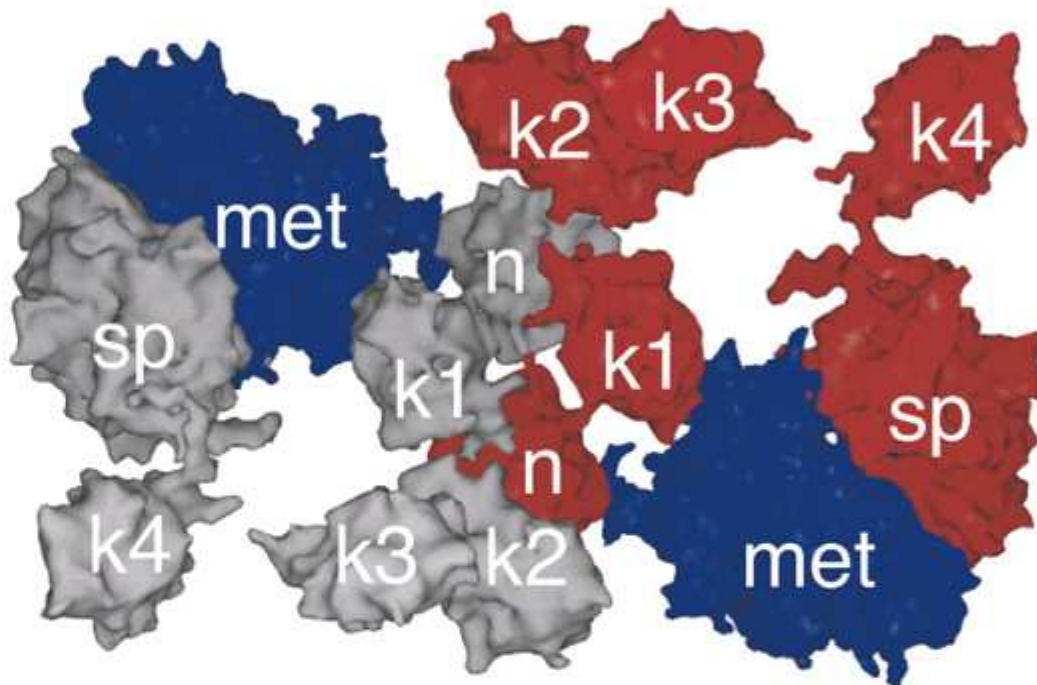
Il est nécessaire que l'HGF/SF soit sous forme mature et active (tcHGF) pour activer le récepteur. La conversion du scHGF inactif en tcHGF actif est donc primordiale pour l'interaction de l'HGF/SF avec son récepteur. Pourtant, les deux formes sont capables de lier le récepteur MET avec la même affinité mais seule la forme clivée et mature est capable d'activer MET (Hartmann et al., 1992; Lokker et al., 1992). Il semble que la maturation de l'HGF/SF permet l'interaction simultanée des deux sites avec MET, comme semble l'indiquer l'éloignement des sites sur la forme mature (Fig. 6 en haut). Pour la forme immature, elle peut s'associer également à MET, mais probablement uniquement via 1 seul site, ce qui semble ne pas permettre son activation. Notons qu'il existe des fragments tronqués de la région C-terminale de l'HGF/SF, naturels ou artificiels (nommés NK1, NK2 ou NK4 selon le nombre de domaines kringle restants), qui peuvent s'associer à MET. Dans certains cas, ils sont de potentiels agonistes ou antagonistes de la signalisation via MET (Chan et al., 1991; Cioce et al., 1996; Date et al., 1997). Notamment, le fragment NK1 de l'HGF/SF est un agoniste de l'HGF/SF uniquement en présence d'héparine. L'absence d'héparine retire tous ses effets (Schwall et al., 1996). Pourtant, ce n'est pas le cas de l'HGF/SF, qui peut activer MET en absence d'héparine, bien que celle-ci favorise son activité, et qu'une interaction entre l'HGF/SF et l'héparine a été montrée (Kemp et al., 2006).



- (a) 2 structures cristallographiques de NK1 sont superposées (1nk1 et 1gp9), montrant l'inclinaison et la rotation de 21.7° du domaine N-terminal (N) par rapport au domaine kringle (K)
- (b) Représentation schématique des 2 structures de dimères différentes, montrant le mouvement de la charnière entre les domaines N et K1

Fig. 7 : Structure cristallographique de NK1

(d'après Watanabe K. & al., 2002)



Modèle en structure pleine de dimérisation entre le domaine SEMA de MET et l'HGF/SF.

Fig. 8 : Modèle de dimérisation de l'HGF/SF avec des domaines SEMA de MET

(d'après Gherardi E. & al., 2006)

La description des zones d'interactions entre MET et l'HGF/SF permettent de dire qu'ils interagissent vraisemblablement selon une stœchiométrie d'ordre 1:1 (Fig. 6 en bas). Mais il reste à établir qui induit la dimérisation des couples HGF/SF-MET, soit l'HGF/SF seul, soit MET alors stabilisé par la présence du ligand.

Pour répondre à cette question, des études cristallographiques ont été réalisées, soit du domaine SEMA (Gherardi et al., 2003; Stamos et al., 2004), soit de fragments de l'HGF/SF correspondant au domaine N-terminal (N) (Zhou et al., 1998), ou au domaine N et K1 (NK1) en présence (Lietha et al., 2001) ou en absence d'héparine (Lietha et al., 2001; Watanabe et al., 2002) (Fig. 7). Le domaine SEMA de MET bien que nécessaire à la dimérisation du récepteur, n'a jamais été découvert en homodimère en solution, mais c'est aussi le cas de l'HGF/SF de pleine longueur. Par contre, des homodimères ont été obtenus en purifiant des domaines NK1 en présence d'héparine, suggérant un rôle de cette région dans la dimérisation. Ces domaines NK1 peuvent former des dimères tête-bêche, ce qui conduit à un changement de leur conformation (Fig. 7, superposition des deux conformations possibles de NK1, montrant une rotation et une inclinaison possible entre les deux domaines). La structure cristallographique du variant NK1 de l'HGF/SF (Watanabe et al., 2002) a permis de montrer que les homodimères NK1 nécessitent la présence d'héparine qui pourrait être impliqué dans le changement conformationnel de NK1, et par extension, pourrait être important à l'interaction entre l'HGF/SF et MET, car capable d'interagir avec les deux molécules (Lyon et al., 2002). Dans cette structure, la région d'interaction avec MET est présente de chaque côté du dimère (une sur chaque molécule), et chacun de ces sites pourrait théoriquement interagir avec un récepteur, permettant la dimérisation de celui-ci.

A ce jour, il semble que la dimérisation de MET par l'HGF/SF est réalisée sous la forme d'un complexe quaternaire 2:2, induit par la dimérisation des domaines NK1 de 2 molécules d'HGF/SF entraînant chacun un récepteur MET et donc la dimérisation de ceux-ci. (Gherardi et al., 2006) (Fig. 8).

Pour conclure, je vais présenter un modèle de dimérisation qui essaye de prendre en considération tous les éléments connus (Kemp et al., 2006). En absence d'héparine, l'HGF/SF pourrait requérir une interaction avec MET pour pouvoir se dimériser (via NK1 ou d'autres domaines). Ceci est en accord avec l'absence de dimères d'HGF/SF en solution et l'existence de complexes 2:2 en présence de formes tronquées de la région extracellulaire du récepteur MET. L'héparine pourrait rendre inutile l'interaction primaire entre MET et son ligand en permettant lui-même le changement conformationnel de l'HGF/SF, conduisant à l'existence de dimères actifs de ligand. En effet, *in vitro*, l'héparine permet l'oligomérisation de

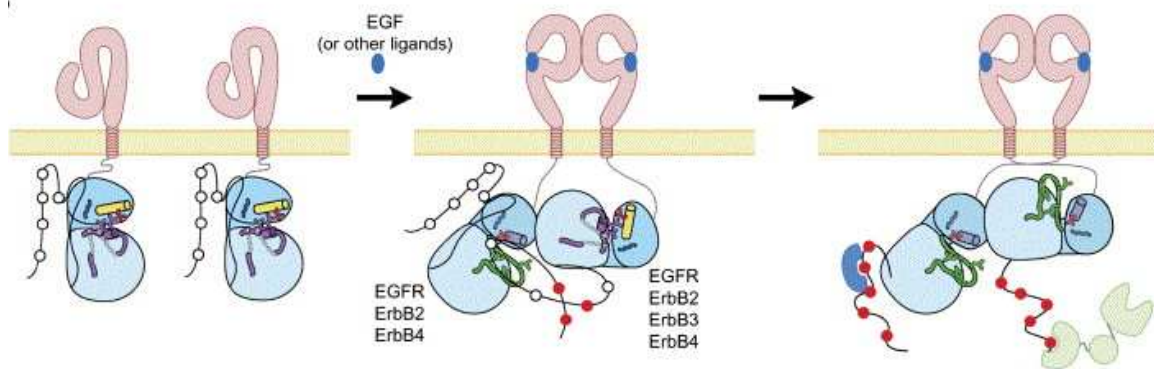


Fig. 9 : Modèle d'activation des récepteurs de la famille à l'EGF.

(d'après Zhang X. & al., 2006)

l'HGF/SF. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'héparine augmente la signalisation induite par l'HGF/SF, bien que n'étant pas nécessaire. Cette hypothèse contrecarre l'idée que la dimérisation du récepteur provient du domaine SEMA de MET, puisque celui-ci n'est pas non plus trouvé en dimère en solution. L'activation du récepteur par sa surexpression pourrait être expliquée par des événements stochastiques de rapprochement des récepteurs, ou bien médiée par des substrats intracellulaires.

La dimérisation du récepteur n'est qu'une première étape pour conduire à son activation. Il faut ensuite que le domaine kinase soit activé pour s'autophosphoryler et recruter des partenaires. Le dogme voulait que la dimérisation du récepteur induise le rapprochement de deux domaines tyrosine kinases, conduisant à leur transautophosphorylation, et ainsi à l'activation des récepteurs. Des travaux récents sur le domaine kinase du récepteur à l'EGF semble contrecarrer ce point de vue, en montrant que les domaines kinases des récepteurs se dimérisent de manière asymétrique, entre le lobe C-terminal de l'un et le lobe N-terminal de l'autre, conduisant à l'activation d'un seul domaine kinase sur les deux engagés (Fig. 9) (Zhang et al., 2006). Ces travaux mettent en lumière un mécanisme inattendu de l'activation du domaine kinase du récepteur à l'EGF, qui s'apparente au mode de régulation des CDK (Cycline dependent kinase) ou à la kinase Src, et pourrait expliquer certaines mutations activatrices des domaines kinases, dont le mode de fonctionnement restait obscur. Il reste à déterminer si ce mode d'activation du domaine kinase du récepteur à l'EGF est généralisable aux autres domaines kinases, en particulier au récepteur MET.

Les avancées récentes des structures et des vues globales des molécules ont permis une grande avancée dans la compréhension du mode d'activation du récepteur MET par son ligand l'HGF/SF. Néanmoins, tout n'est pas encore éclairci et les avancées technologiques d'imagerie et de cristallographie permettront certainement de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses. Une structure complète d'une molécule et non plus de ses différents domaines séparés ou la structure d'un complexe moléculaire entier, par exemple entre MET et l'HGF/SF, lèverait certainement de nombreuses incertitudes.

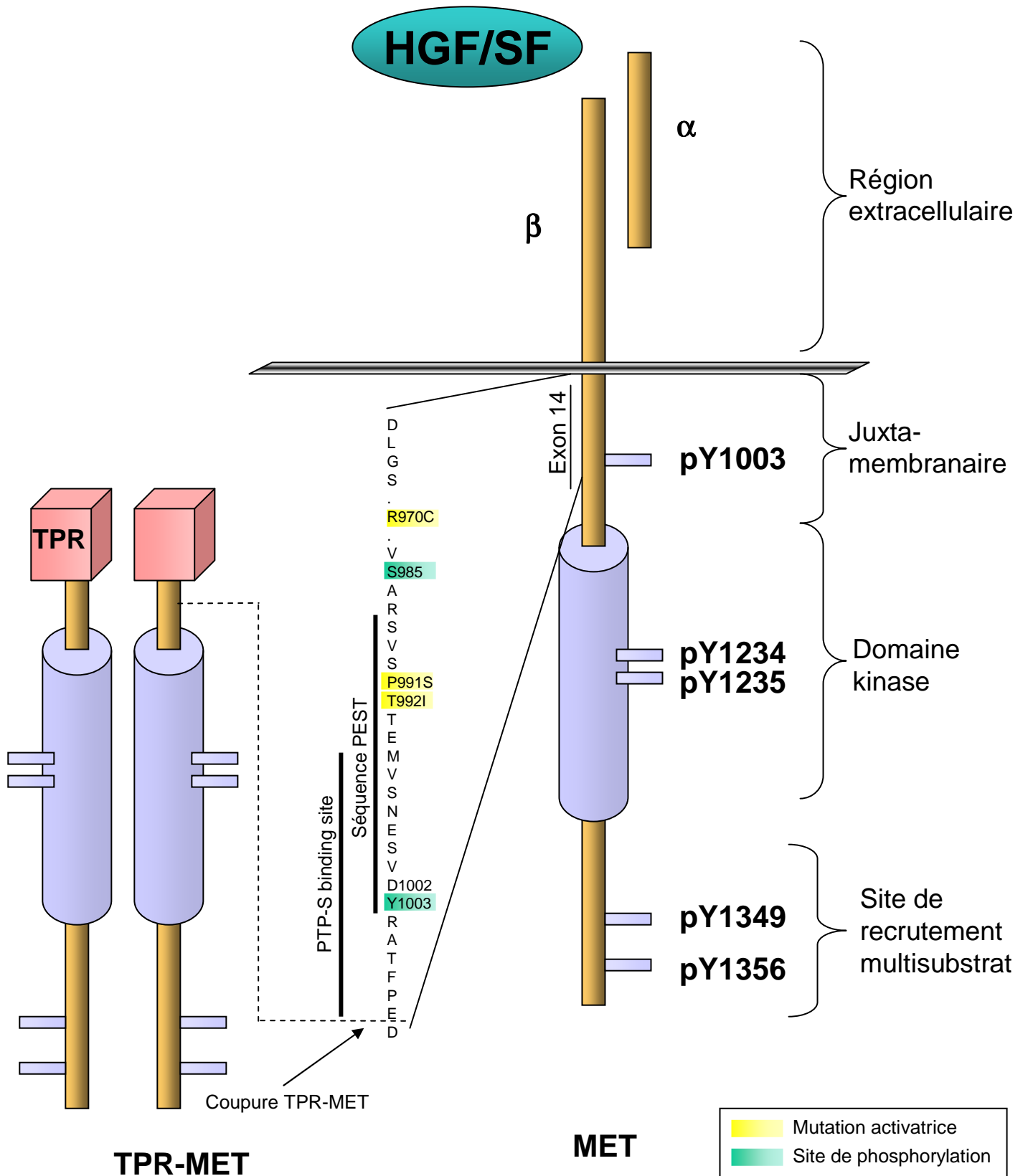


Fig. 10 : Schéma du récepteur MET et sites connus de la région juxtamembranaire.

3. Les autres domaines de régulation

a. La région juxtamembranaire

La région juxtamembranaire est la zone comprise entre le domaine kinase et la région transmembranaire. Sa fonction régulatrice a été découverte grâce à la forme chimérique du récepteur MET en aval de TPR (Translocated promoter region). La fusion TPR-MET est constituée de l'intégralité de la région intracellulaire de MET, à l'exception d'une région de 47 acides aminés comprise entre la membrane et le domaine kinase (a.a. 962-1009) correspondant à l'exon 14. La réintroduction de cette région dans TPR-MET conduit à une forte diminution de la transformation induite par la chimère, accompagné de la diminution de la prolifération cellulaire, de la croissance sans ancrage, de la motilité ainsi que ses capacités d'invasion (Vigna et al., 1999). En conclusion, la présence de la région juxtamembranaire contrebalance les effets transformants de TPR-MET, et peut donc être classée comme une région inhibitrice du récepteur. De plus, il existe un variant d'épissage alternatif naturel du récepteur MET décrits dans des tissus murins, auquel il manque l'exon 14 (Lee and Yamada, 1994). Ce variant MET^{juxta-} présente un profil de protéines phosphorylées sur des tyrosines différentes, ainsi qu'une meilleure association avec la sous-unité p85 de PI3K en comparaison du récepteur sauvage. Ceci suggère une implication de la région juxtamembranaire dans la régulation sélective de MET avec ses partenaires (Lee and Yamada, 1995). Enfin, des mutations somatiques sur des régions introniques du gène de met ont été identifiées dans des cancers du poumon, conduisant à l'épissage alternatif de l'exon 14, et augmentant l'activité de ce récepteur tronqué (Kong-Beltran et al., 2006).

Pour expliquer la fonction négative de cette région, différents sites de régulation de MET ont été identifiés (Fig. 10), en particulier deux sites de phosphorylation, la Ser⁹⁸⁵ et la Tyr¹⁰⁰³ (Y2). La sérine S985 est phosphorylée en réponse à un traitement au TPA (un activateur de protéine kinase C (PKC)), et cette phosphorylation a été associée à la diminution de la phosphorylation sur les tyrosines du récepteur MET (Gandino et al., 1994). Il a ensuite été montré que la phosphorylation de la sérine S985 était régulée de manière bidirectionnelle par l'activité opposée des PKC δ et ϵ , capable de la phosphoryler, et de la protéine phosphatase 2A (PP2A), qui la déphosphoryle. En outre, le stress oxydant induit la phosphorylation de S985 par les PKC, associé à la diminution de la phosphorylation de MET sur les tyrosines en réponse à l'HGF/SF, décryptant un mécanisme de désensibilisation du

récepteur à son ligand, selon l'environnement ou les conditions cellulaires (Hashigasako et al., 2004).

La tyrosine Y1003 (ou Y2) est une cible d'autophosphorylation du récepteur. Sa mise en évidence a été réalisée par des mutations systématiques de toutes les tyrosines du récepteur (de Y1 à Y16, de la région transmembranaire au C-terminal) (Weidner et al., 1995). La mutation de la Y2 par une phénylalanine est une mutation gain-de-fonction, donnant aux cellules épithéliales MDCK exprimant stablement un tel mutant un aspect fibroblastoïde par une perte des jonctions cellulaires et une dispersion constitutive. Il a ensuite été montré que l'E3 ubiquitine ligase CBL s'associait via son domaine Tyrosine Kinase Binding (TKB) à la tyrosine Y2, et que cette perte d'interaction conduisait à un défaut de dégradation du récepteur, induisant un effet transformant de cette mutation (Peschard et al., 2001).

D'autres éléments de régulation ont été localisés dans la région juxtamembranaire du récepteur MET, que l'on peut citer en vrac : un domaine PEST responsable de la dégradation de MET par clivage protéolytique a été localisé entre la sérine S988 et la tyrosine Y1003 (Crepaldi et al., 1994). Une région liant une activité phosphatase qui pourrait être la PTP-S (ou TC-PTP), entre les acides aminés 995 et 1009 (Villa-Moruzzi et al., 1993; Villa-Moruzzi et al., 1998).

Enfin, des mutations activatrices de MET dans les cancers ont été identifiées dans la région juxtamembranaire, bien que nous ignorions encore par quels mécanismes elles influent sur l'activité du récepteur, il s'agit des mutations R988C (ou R970C) (Ma et al., 2003; Tjin et al., 2006), T1010I (ou T992I) (Jagadeeswaran et al., 2006; Lee et al., 2000; Ma et al., 2003; Tengs et al., 2006; Wasenius et al., 2005) et P1009S (ou P991S) (Lee et al., 2000) (voir chapitre MET & cancer). [N.B. : Les numéros de séquence correspondent à la séquence humaine dont deux nomenclatures existent dans la littérature. La correspondance entre les deux est de +18 acides aminés.]

b. La région C-terminale

La région C-terminale du récepteur contient deux tyrosines cruciales pour le recrutement des partenaires, via un site de recrutement multi-substrat (Ponzetto et al., 1994). Les tyrosines Y1349 (Y14) et Y1356 (Y15), sont phosphorylées en réponse au ligand, recrutent un grand nombre de substrats que je détaillerai plus loin, et médient les fonctions biologiques du récepteur.

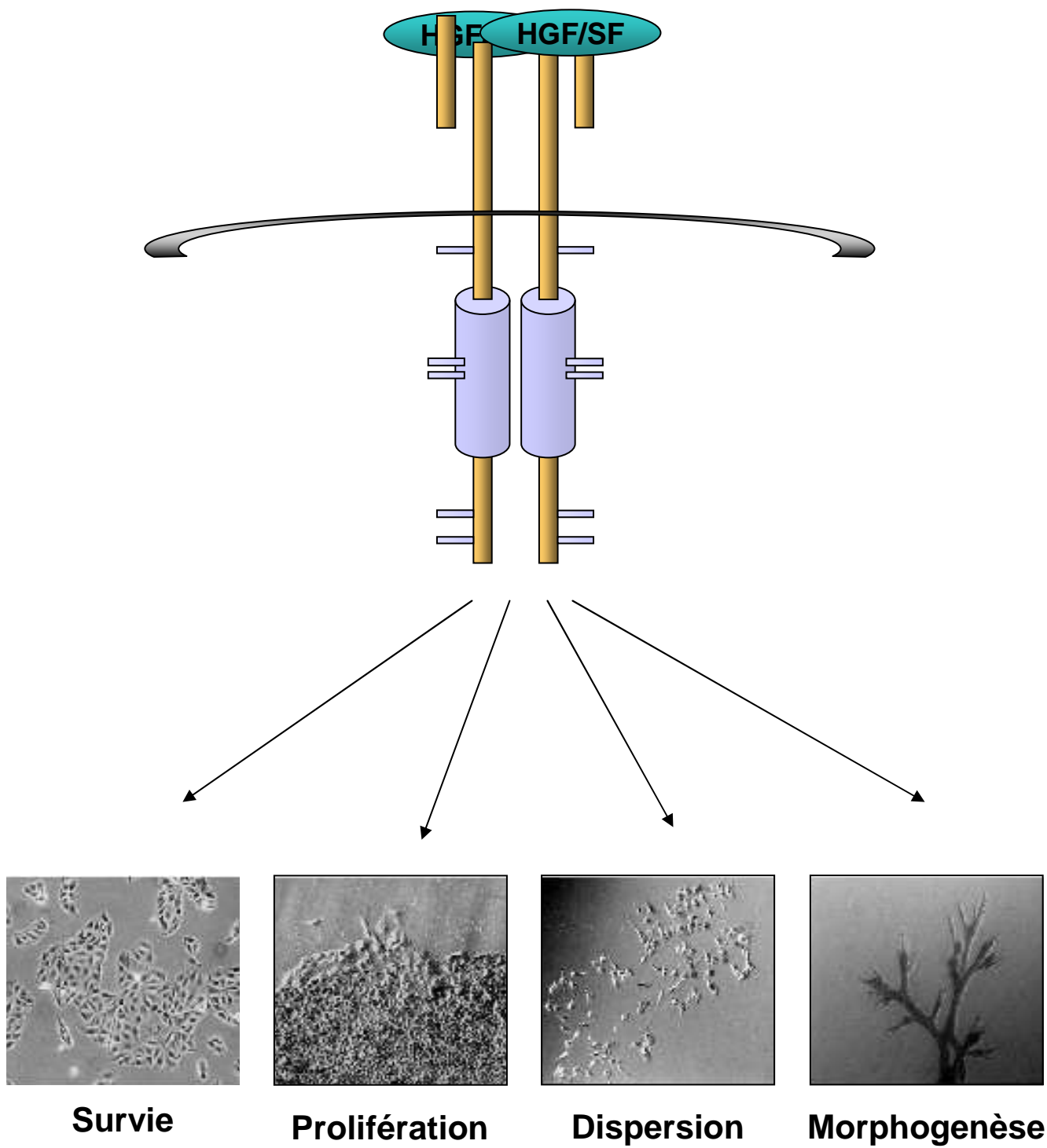


Fig. 11: Les effets biologiques de l'HGF/SF en culture cellulaire

4. Les activités biologiques du couple HGF/SF-MET

a. En culture cellulaire

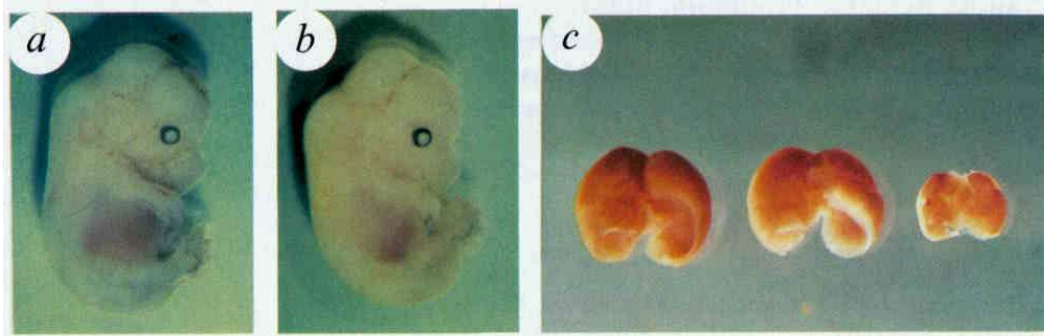
A l'origine, l'HGF/SF a été isolé comme un facteur de croissance pour les hépatocytes *in vitro*, puis indépendamment comme un facteur capable de stimuler la dispersion et la motilité des cellules épithéliales. Il a ensuite été montré comme favorisant la survie des cellules épithéliales, et enfin, l'HGF/SF a été identifié comme un facteur dérivé des fibroblastes nécessaire et suffisant pour stimuler la morphogenèse des cellules épithéliales. La morphogenèse induite dépend du type de morphogenèse que sont capable de réaliser les cellules (morphogenèse de branchement pour cellules mammaires ou rénales, alvéoles pour des cellules pulmonaires, etc ...). Par exemple, pour la morphogenèse de branchement *in vitro* : l'HGF/SF stimule quelques cellules épithéliales parmi le kyste à modifier leur polarité et à s'étaler. S'ensuit la formation de chaînes de cellules, qui en s'allongeant et s'épaississant, ré-établissent leur polarité cellulaire et développent des petites lumières qui se regroupent pour former une lumière continue.

L'HGF/SF est donc un facteur pléiotropique, capable d'induire la motilité cellulaire, la prolifération, la survie, la dispersion, la croissance sans ancrage et la morphogenèse (Fig. 11). En fait, ces différentes facettes de la signalisation par l'HGF/SF sont toutes requises, pour induire la morphogenèse. Par conséquent, l'inhibition d'une voie de signalisation impliquée dans la survie, la dispersion ou la motilité bloque systématiquement la morphogenèse de branchement. Le résultat final de la signalisation induite par l'HGF/SF dépend vraisemblablement de la durée et de la force du signal, ainsi que de l'existence de stimuli environnementaux, comme des interactions avec la matrice extra-cellulaire.

b. « *In vivo* »

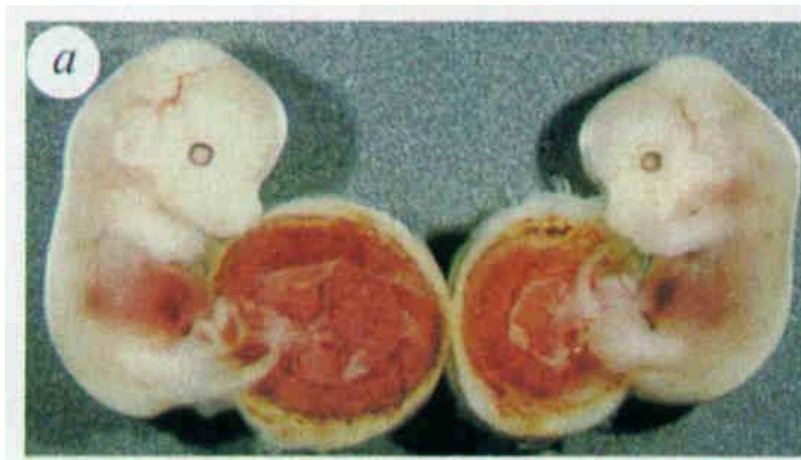
i Au cours du développement

L'HGF/SF et MET sont exprimés au cours de l'embryogenèse chez la souris de manière très précoce (stade blastula). Pendant la gastrulation (6,5 à 7 j de développement), l'expression conjointe du couple HGF/SF-MET est trouvée dans le mésoderme dérivé de la



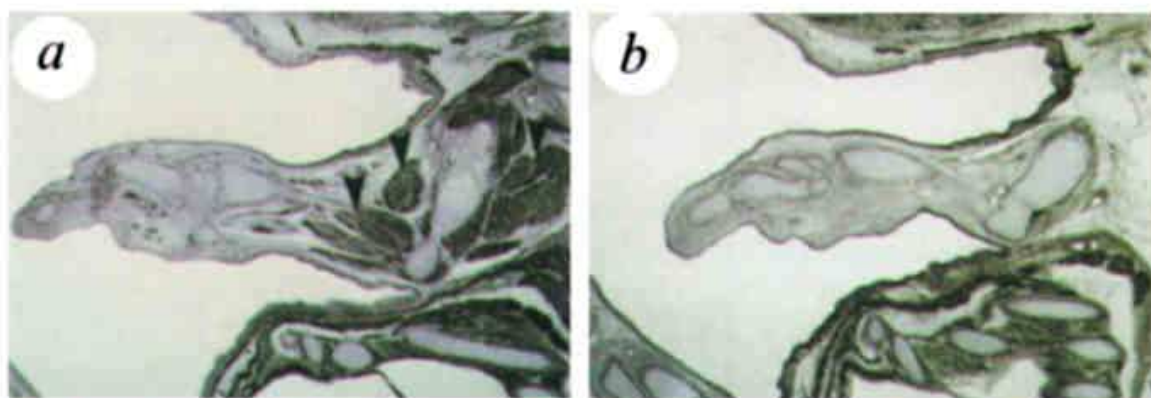
Apparence externe d'embryon HGF/SF^{+/+} (a) et HGF/SF^{-/-} (b) à E14.5 (x3,7). Apparence externe des foies (c) d'embryon sauvage (à gauche), HGF/SF^{+/+} (au centre) et HGF/SF^{-/-} (à droite) à E14.5 (x9)

(d'après Schmidt C & al., 1995)



Apparence externe d'embryon sauvage (à gauche) et HGF/SF^{-/-} (à droite) à E13.5 montrant les défauts de formation du placenta.

(d'après Uehara Y & al., 1995)



Section d'embryon c-met^{+/+} (a) et c-met^{-/-} (b) à E15.5, hybridée avec des anticorps spécifiques de la desmine et contre-coloré avec de l'hématoxyline. On voit clairement le défaut de développement des muscles du membre indiqué par une flèche.

(d'après Bladt F & al., 1995)

Fig. 12: Phénotypes des embryons HGF/SF^{-/-} ou MET^{-/-}

blastula et entourant l'endoderme, suggérant un mode d'action autocrine. Plus tard, pendant l'organogenèse (8-10 j de développement) et jusqu'à la fin du développement de l'embryon, le patron d'expression de ces deux gènes devient distinct ; l'HGF/SF est exprimé dans le mésenchyme et MET est exprimé dans les cellules épithéliales, endothéliales et myogéniques adjacentes, indiquant plutôt un mode d'action paracrine (Andermarcher et al., 1996). Cette spécificité suggère que le couple HGF/SF-MET joue un rôle important dans les interactions épithélium-mésenchyme au cours de l'organogenèse. La signalisation de MET a été montrée pour favoriser la morphogenèse pendant la formation de plusieurs organes, tels que le rein, la glande mammaire, le foie, le placenta, les testicules, le pancréas et les poumons (Birchmeier and Gherardi, 1998). MET et l'HGF/SF sont également importants dans le développement du système nerveux, par des effets de survie, de différenciation et de croissance axonale (Maina and Klein, 1999), et le développement normal du cervelet (Ieraci et al., 2002), mais aussi dans la mise en place des muscles squelettiques antérieurs (Haines et al., 2004; Prunotto et al., 2004).

L'extinction du gène codant MET ou l'HGF/SF a confirmé l'hypothèse de l'implication de ce couple dans les interactions épithélium-mésenchyme, puisque les souris MET^{-/-} ou HGF/SF^{-/-} meurent *in utero* au même stade embryonnaire et pour des défauts similaires, dont un défaut de formation du placenta (Fig. 12) (Bladt et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995). Ces souris présentent également une réduction de la taille du foie provoquée par un défaut de prolifération des hépatocytes (Schmidt et al., 1995) et un défaut de migration des cellules précurseurs des muscles squelettiques dans le bourgeon de membre (Bladt et al., 1995). L'ensemble des défauts obtenus par l'extinction du gène de MET ou de l'HGF/SF corroborent remarquablement les réponses obtenues *in vitro*.

ii *Chez l'adulte*

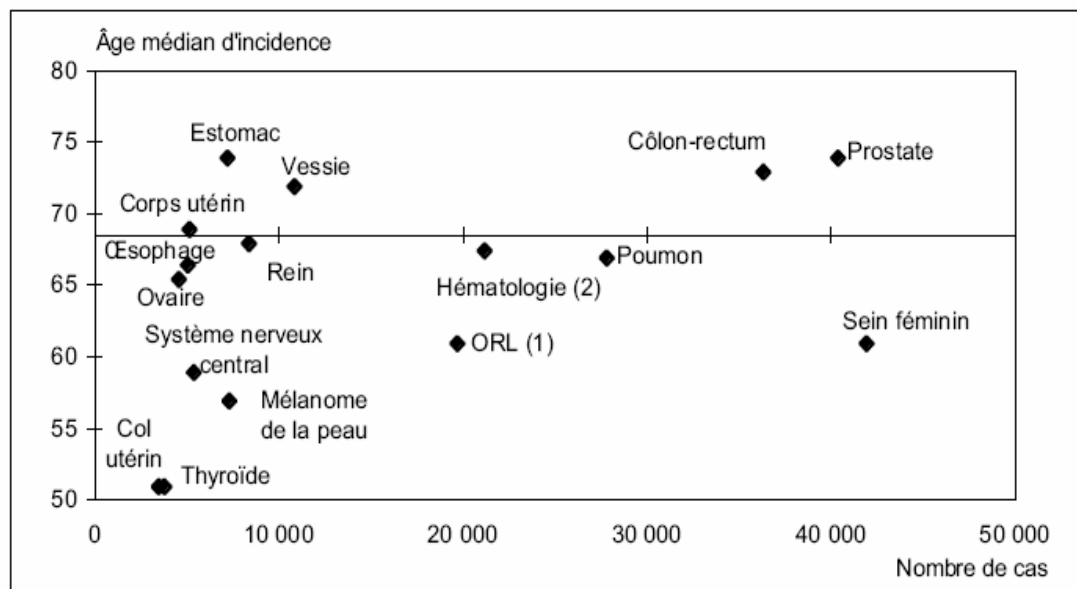
L'HGF/SF stimule également la morphogenèse de branchement dans le foie et le rein adulte, lors de la réparation de l'organe après hépatectomie partielle ou un rein abîmé (Balkovetz and Lipschutz, 1999; Schmidt et al., 1995). D'ailleurs, des systèmes de knock-out conditionnels ont permis de montrer le rôle essentiel de MET et de l'HGF/SF dans la régénération du foie (Borowiak et al., 2004; Huh et al., 2004; Phaneuf et al., 2004). Dans la glande mammaire, le niveau élevé d'expression de MET et d'HGF/SF corrèle avec des périodes de tubulogenèse active, l'expression étant élevée en début de grossesse, puis absente

Tableau 2 – Incidence estimée des cancers en France en 2000 selon le sexe

	Hommes	Femmes	Les deux sexes
Sein (1)	///	41 845	41 845
Prostate	40 309	///	40 309
Colon-rectum	19 431	16 826	36 257
Poumon	23 152	4 591	27 743
Lèvres, bouche, pharynx	12 990	2 398	15 388
Vessie	8 986	1 785	10 771
Lymphome malin non hodgkinien	5 527	4 381	9 908
Rein	5 306	2 987	8 293
Mélanome	3 066	4 165	7 231
Estomac	4 520	2 606	7 126
Leucémies	3 609	2 634	6 243
Foie	5 014	962	5 976
Système nerveux central	2 697	2 602	5 299
Corps utérin	///	5 064	5 064
Œsophage	4 040	928	4 968
Pancréas	2 701	2 186	4 887
Ovaire	///	4 488	4 488
Larynx	3 865	361	4 226
Thyroïde	821	2 890	3 711
Myélome	1 942	1 645	3 587
Col utérin	///	3 387	3 387
Maladie de Hodgkin	736	631	1 367
Mésotéliome	671	200	871
Autres cancers	11 642	7 666	19 308
Total cancers	161 025	117 228	278 253

(1) Les cancers du sein masculin, très rares (112 décès en 1999), ne donnent pas lieu à une estimation d'incidence.
 Champ : France métropolitaine.
 Source : Réseau FRANCIM des registres du cancer.

Tableau 3 – Répartition des cancers selon l'âge médian d'incidence et la fréquence en 2000



Note : L'axe horizontal représente l'âge médian d'incidence, tous cancers confondus
 Lecture : Le cancer de la thyroïde est relativement peu fréquent et il atteint des personnes nettement plus jeunes que la référence représentée par l'ensemble des cancers ; le cancer de la prostate est un cancer fréquent des hommes âgés.
 (1) Lèvre, bouche, pharynx et larynx.
 (2) Leucémies, maladie de Hodgkin, lymphome malin non hodgkinien, myélome multiple.
 Champ : France métropolitaine.
 Source : Réseau Francim des registres du cancer.

(d'après les données sur la situation sanitaire et sociale en France en 2005)

en fin de grossesse et en période de lactation, quand démarre la différenciation glandulaire (Soriano et al., 1998; Yang et al., 1995). En plus de ses effets morphogènes, l'HGF/SF induit également la prolifération des hépatocytes, des cellules de la glande mammaire, des cellules rénales et des myoblastes (Birchmeier and Gherardi, 1998). L'HGF/SF et MET sont impliqués dans d'autres types de cellules, je citerais pour exemple que l'HGF/SF induit la prolifération et la différenciation des cellules de la pulpe dentaire (Ye et al., 2006).

5. MET-HGF/SF et Cancer

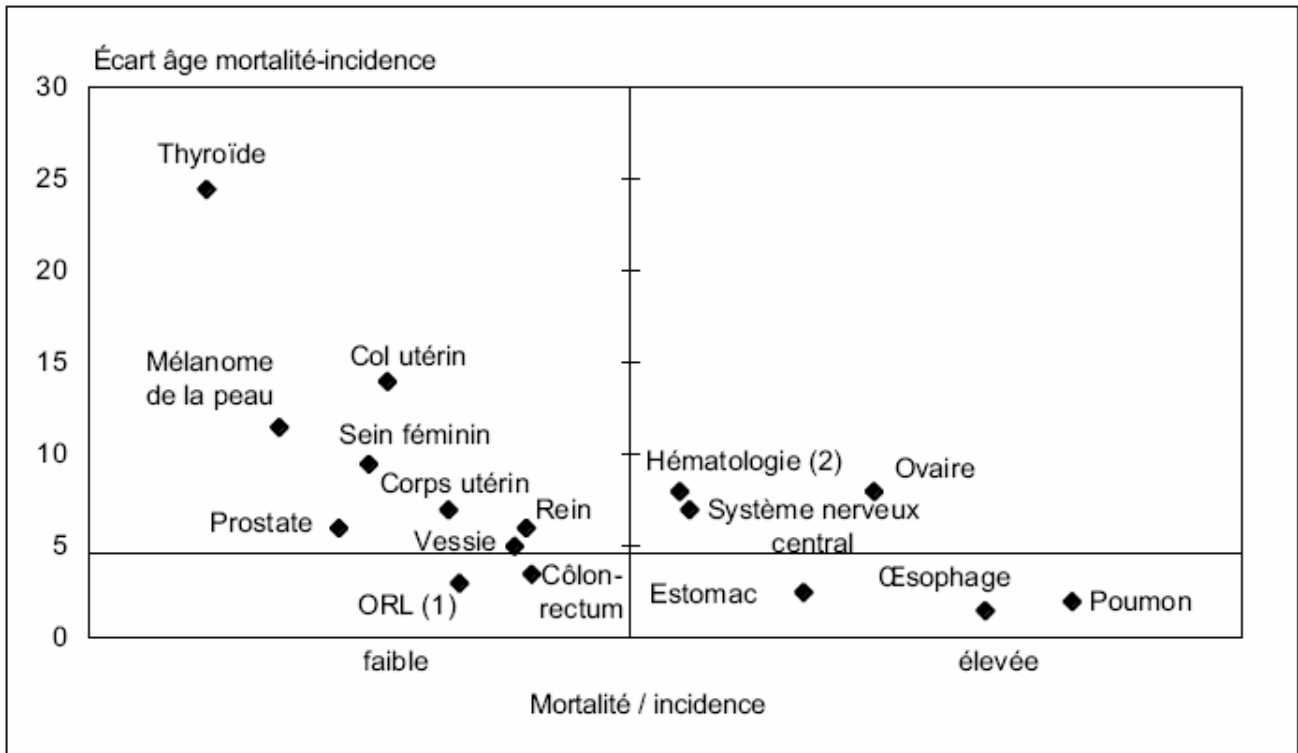
a. Données générales sur l'incidence des cancers en France

Avec près de 145 000 décès en 2001, les cancers représentent la deuxième cause de mortalité en France et la première cause de mortalité prématurée. Entre 50 et 64 ans, près de 48 % des décès sont dus à une tumeur maligne. Chez les femmes de cette tranche d'âge, plus d'un décès sur deux est dû à un cancer. La France a le plus fort taux d'incidence de l'Union européenne pour l'ensemble des cancers chez l'homme. Ce sont surtout les cancers du poumon et de la prostate qui expliquent ces chiffres élevés chez les hommes. L'incidence des cancers chez la femme en France se situe dans la moyenne des autres pays européens mais la survenue de cancers du sein y est plutôt importante (Source : Données sur la situation sanitaire et sociale en France en 2005, DREES, Ministère de la santé : <http://www.sante.gouv.fr/drees/donnees/donnees2005.pdf>).

En 2000, l'incidence annuelle a été estimée à 278 000 nouveaux cas (Tableau 2), dont 58 % chez les hommes et quatre sur dix avant 65 ans. Les cinq localisations les plus fréquentes sont les cancers du sein féminin (41 800 cas), de la prostate (environ 40 300 cas), du colon et du rectum (36 300 cas), du poumon (27 700 cas) et des voies aérodigestives supérieures (lèvre, bouche, pharynx, larynx et œsophage, 24 600 cas). Les cancers du col de l'utérus et de la thyroïde concernaient pour la même année respectivement 3 387 et 3 711 personnes. Le cancer de la prostate devient la première cause de cancer chez les hommes en lien avec le vieillissement de la population et l'évolution des prises en charge diagnostiques et thérapeutiques.

On peut distinguer quatre groupes de cancers selon leur fréquence d'apparition (Tableau 3):

Tableau 4 – Durée de survie et taux de létalité par localisation de cancer



Lecture : la durée médiane entre la découverte d'un cancer du poumon et le décès de la personne est d'environ deux ans et le rapport entre le nombre de personnes décédant de ce cancer et le nombre de personnes atteintes est élevé.

(1) Lèvre, bouche, pharynx et larynx.

(2) Leucémies, maladie de Hodgkin, lymphome malin non hodgkinien, myélome multiple.

Champ : France métropolitaine.

Source : Réseau Francim des registres du cancer.

(d'après les données sur la situation sanitaire et sociale en France en 2005)

- les cancers fréquents, souvent découverts à un âge relativement jeune : cancers du sein, du poumon, de la sphère ORL et cancers hématologiques ;
- ceux, fréquents, découverts à un âge élevé : cancers de la prostate et du côlon ;
- ceux d'incidence moins élevée, découverts à un âge jeune : cancers du col de l'utérus, de la thyroïde, mélanomes ;
- et enfin les cancers moins fréquents, découverts à un âge plus élevé : cancers de la vessie et de l'estomac.

On peut également distinguer quatre groupes de cancers selon le taux de mortalité (Tableau 4):

- les cancers entraînant une mortalité élevée et rapide : cancers du poumon, de l'estomac et de l'œsophage ;
- ceux qui ont une mortalité élevée mais dans des délais plus longs : cancers de l'ovaire, hématologiques et du système nerveux central ;
- ceux qui induisent une mortalité plus faible mais, le cas échéant, rapide : cancers ORL ;
- enfin ceux pour lesquels la mortalité est faible dans des délais importants : cancers de la thyroïde surtout et, dans une moindre mesure, cancers de la peau, du sein ou du col utérin.

b. HGF/MET & Cancer

La dérégulation de la signalisation de MET et de l'HGF/SF apparaît comme une caractéristique cruciale de nombreux types de cancers humains. Cela est devenu incontestable et diverses approches expérimentales le confirment : tout d'abord, les lignées cellulaires humaines ou murines qui surexpriment MET et/ou l'HGF/SF deviennent tumorigènes et métastatiques dans des souris *nude* (Rong et al., 1994). Corollairement, la diminution de l'expression de MET ou de l'HGF/SF dans des cellules tumorales humaines diminue leur potentiel tumorigène (Abounader et al., 2002). Deuxièmement, les modèles murins qui expriment le récepteur ou le ligand comme un transgène développent différents types de tumeurs et de lésions métastatiques (Takayama et al., 1997). Troisièmement, un grand nombre d'études montrent que l'HGF/SF et/ou MET sont fréquemment exprimés dans les carcinomes, dans d'autres types de tumeurs solides, et que la perte de régulation de l'expression de MET ou de l'HGF/SF corrèle souvent avec un mauvais pronostic. Bien que la quantification de l'expression de MET soit délicate, la corrélation entre l'expression et le pronostic est

Catégorie	Type de cancer	Expression de l'HGF/SF	Expression de MET	Mauvais pronostic	Mutation de MET	Développement de thérapies
Carcinomes	Cholangiocarcinome	Non	Oui	Non	Non	Non
	Col de l'utérus	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
	Colo-rectal	Oui	Oui	Non	Non	Oui
	Estomac	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
	Foie	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
	Nasopharynx	Oui	Oui	Oui	Non	Non
	Œsophage	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
	Ovaire	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
	Pancréas – vésicule biliaire	Oui	Oui	Non	Non	Oui
	Poumon	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
	Prostate	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
	Rein	Oui	Oui	Non	Oui	Oui
	Sein	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
	Tête et cou	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
	Thyroïde	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
Vessie	Oui	Oui	Oui	Non	Non	
Sarcomes de muscles squelettiques	Ostéosarcome	Oui	Oui	Non	Oui	Oui
	Rhabdomyosarcome	Non	Oui	Non	Non	Non
	Sarcome synovial	Oui	Oui	Oui	Non	Non
Sarcomes de tissus mous	HFM/ Fibrosarcome	Oui	Oui	Non	Non	Oui
	Leiomyosarcome	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
	Sarcome de Kaposi	Oui	Oui	Non	Non	Non
Leucémies	Leucémie aiguë myélogénous	Oui	Non	Non	Non	Non
	Leucémie de cellules T adulte	Non	Oui	Non	Non	Non
	Leucémie myéloïde chronique	Oui	Non	Non	Non	Non
	Lymphomes	Oui	Oui	Non	Oui	Non
	Myélomes multiples	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Autres types de cancers	Glioblastomes / Astrocytomes	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
	Mélanomes	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
	Mésothéliomes	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
	Tumeur de Wilm	Oui	Oui	Non	Non	Oui

Les colonnes correspondent à : l'expression d'HGF/SF dans les biopsies de tumeurs; l'expression de MET dans les biopsies de tumeurs; l'expression de MET et de l'HGF/SF corrélées avec un mauvais pronostic; mutations germinales ou sporadiques de MET; HFM : Histiocytome fibreux malin

Tableau 5 : Implication de MET et de l'HGF/SF dans les cancers

(d'après <http://www.vai.org/met/>, où sont citées les références)

convaincante. Quatrièmement, une évidence sans ambiguïté qui implique MET dans les cancers humains est la découverte de mutations activatrices du récepteur dans des formes héréditaires et sporadiques de cancers rénaux papillaires (Schmidt et al., 1997; Schmidt et al., 1998). De telles mutations, qui modifient la séquence du domaine kinase de MET, ont été ensuite découvertes dans d'autres types de cancers et de lésions métastatiques.

i Perte de la régulation de l'HGF/SF

Le niveau élevé d'HGF/SF dans des tumeurs ou le plasma sanguin a été observé dans un grand nombre de cancers (poumon, sein, l'estomac, colo-rectal, prostate, tête et cou, foie, vessie, des leucémies et des myélomes) (Tableau 5). Les cellules de la tumeur, en particulier les cellules stromales sont des sources potentielles d'HGF/SF. Le récepteur MET semble le plus souvent activé de façon paracrine par la surexpression de l'HGF/SF dans les cellules stromales avoisinantes, telles que les fibroblastes et les cellules endothéliales, avec une activation protéolytique par des protéases extracellulaires. Des études en co-culture ont montré que la croissance des carcinomes induite par les fibroblastes était inhibée par des anticorps bloquants anti-HGF/SF, impliquant donc l'HGF/SF comme acteur moléculaire de l'interaction tumeur/stroma. De plus, il a été montré que l'expression de l'HGF/SF est régulée positivement dans les cellules stromales par des cytokines et des facteurs de croissance sécrétés par les cellules cancéreuses (Gohda et al., 1994; Tamura et al., 1993). Des stimulations autocrines de l'HGF/SF-MET ont été identifiées dans de nombreux cancers humains tels que le sein, le poumon, l'estomac, des gliomes, de multiples myélomes, des leucémies et dans certains sarcomes (Christensen et al., 2005). Ces stimulations autocrines se produisent vraisemblablement à cause de l'expression ectopique de l'HGF/SF dans les carcinomes, ou de MET dans les sarcomes.

ii Perte de la régulation de MET

Un grand nombre de mécanismes induisent la dérégulation et l'activation de MET dans des cancers humains, dont la surexpression, l'activation constitutive de l'activité kinase, par des activations paracrine ou autocrine de MET par l'HGF/SF ou des mutations du récepteur MET.

(a) Activation indépendante du ligand de MET

En plus des mécanismes dépendant du ligand, l'activation de MET peut se produire par (1) des mutations ponctuelles, (2) la dimérisation constitutive en absence du ligand due à la surexpression (Wang et al., 2001), (3) des troncatures de MET (Wallenius et al., 2000), (4) des translocations/réarrangements de gènes, (5) l'activation des voies de signalisation en condition d'hypoxie (Pennacchietti et al., 2003), (6) la transactivation par d'autres récepteur tels que l'EGFR ou RON (Jo et al., 2000; Maggiora et al., 2003) et (7) la perte de régulateurs négatifs tels que VHL dans les carcinomes rénaux (Oh et al., 2002). Ces mécanismes peuvent soit partiellement, soit complètement éliminer la dépendance de MET envers son ligand. Néanmoins, l'implication des ces mécanismes d'activation dans les tumeurs humaines est peu connue. La majorité des carcinomes exprimant MET et l'HGF/SF, souvent de manière élevé, semble montrer que les voies menant à l'oncogenèse passent plus par des voies ligand-dépendantes.

(b) Surexpression du récepteur

MET est exprimé dans la plupart des carcinomes et sa surexpression en comparaison avec les tissus normaux a été détectée dans de nombreux cancers tels que les cancers du poumon, du sein, colo-rectal, de la prostate, du pancréas, de la tête et du cou, de l'estomac, du foie, de l'ovaire, du rein mais aussi des gliomes, mélanomes, et plusieurs sarcomes (Tableau 5) (Birchmeier et al., 2003). L'expression de MET est régulée positivement dans les tumeurs par différents mécanismes épigénétiques tels que la sécrétion de facteur de croissance, l'hypoxie des tumeurs et l'activation d'autres oncogènes (Hara et al., 2006; Moghul et al., 1994; Pennacchietti et al., 2003). De plus, l'amplification du gène de MET et par conséquent sa surexpression a été rapportée dans des cancers gastriques, colorectaux et des gliomes (Di Renzo et al., 1995; Kijima et al., 2002; Kuniyasu et al., 1992; Tsugawa et al., 1998; Wullich et al., 1994).

Tableau 6 : Les mutations de MET retrouvées dans les cancers.

Mutation	Type de tumeur	Activation indépendante du ligand	Références
Dans le domaine SEMA			
E168D (s)	Cancer du poumon à petites cellules	?	Ma (2003)
N375S (s)	Mésothéliome pleural malin	?	Jagadeeswaran (2006)
M431V (s)	Mésothéliome pleural malin	?	Jagadeeswaran (2006)
N454I (s)	Mésothéliome pleural malin	?	Jagadeeswaran (2006)
P791L (g)	Cancer de l'estomac	?	Kim (2003)
Dans la région juxtamembranaire			
G983S (g)	Rottweiler : prédisposition au cancer ?	Oui ?	Liao (2006)
R988C (s,g)	Cancer du poumon à petites cellules, lymphome de type B	Oui (faible)	Ma (2003), Tjin (2006)
P1009S (g)	Cancer de l'estomac	Non	Lee (2000)
T1010I (g,s)	Cancer du poumon à petites cellules et non à petites cellules, carcinome papillaire rénal, cancer du sein, mésothéliome pleural malin, carcinome de la thyroïde	Oui (faible)	Schmidt (1999), Lee (2000), Ma (2003), Wasenius (2005), Tengs T (2006), Jagadeeswaran (2006)
G1095X (s)	Mésothéliome pleural malin	?	Jagadeeswaran (2006)
Dans le domaine kinase : Dans la région de fixation de l'ATP			
V1110I (g)	Carcinome papillaire rénal	Oui	Schmidt (1999), Olivero (1999)
N1118Y (s)	Métastases	Oui	Lorenzato (2002)
H1112L (s)	Carcinome papillaire rénal	Oui (faible)	Schmidt (1999)
H1112Y (s,g)	Carcinome papillaire rénal	Oui	Schmidt (1999), Berthou (2004)
H1112R (g)	Carcinome papillaire rénal, métastases	Oui (faible)	Schmidt (1998), Lorenzato (2002)
H1124D (s)	Carcinome papillaire rénal	Oui (faible)	Schmidt (1999)
G1137V (s)	Gliome	?	Moon (2000)
Dans la région d'articulation			
M1149T (g)	Carcinome papillaire rénal	Oui (faible)	Schmidt (1997), Jeffers (1997), Giordano (2000)
R1166Q (g)	Lymphome de type B	?	Tjin (2006)
T1191I (s)	Hépatocarcinome de l'enfant	?	Park (1999), Maritano (2000)
V1206L (g)	Carcinome papillaire rénal	Oui (faible)	Schmidt (1997), Jeffers (1997)
L1213V (s)	Carcinome papillaire rénal	Oui	Schmidt (1997), Bardelli (1998), Jeffers (1999), Giordano (2000), Berthou (2004)
A1227G (s)	Cancer ovarien	?	Tanyi (1999)
V1238I (g)	Carcinome papillaire rénal	Oui	Schmidt (1997), Jeffers (1997), Schmidt (1999)
Dans la boucle d'activation			
D1246H (s)	Carcinome papillaire rénal	Oui	Schmidt (1997), Jeffers (1997), Bardelli (1998), Maritano (2000), Giordano (2000)
D1246N (g)	Carcinome papillaire rénal	Oui	Schmidt (1997), Jeffers (1997), Maritano (2000)
Y1248H (s)	Carcinome papillaire rénal	Oui	Schmidt (1997), Jeffers (1997), Bardelli (1998), Berthou (2004)
Y1248D (g)	Carcinome papillaire rénal	Oui	Schmidt (1999)
Y1248C (s,g)	Carcinome papillaire rénal, Carcinome squameux de l'oropharynx, métastases	Oui	Schmidt (1997), Jeffers (1997), Bardelli (1998), Di Renzo (2000), Giordano (2000), Lorenzato (2002)
K1262R (s)	Hépatocarcinome de l'enfant	Oui	Park (1999), Maritano (2000)
Dans la boucle P+1			
Y1253D (s)	Carcinome squameux de l'oropharynx, métastases	Oui	Di Renzo (2000), Lorenzato (2002), Aebersold (2003), Cristiani (2005)
M1268T (s)	Carcinome papillaire rénal	Oui (forte)	Schmidt (1997), Jeffers (1997), Bardelli (1998), Schmidt (1999), Jeffers (1999), Nakaigawa (2000), Giordano (2000), Maritano (2000), Berthou (2004)
M1268I (s)	Hépatocarcinome de l'enfant	?	Park (1999), Maritano (2000)

g : lignée germinale, s : cellule somatique

N.B. : Les chiffres correspondent à la séquence de MET humain, une autre nomenclature existe, il faut enlever 18 acides aminés pour la correspondance.
Ex : M1268T = M1250T

(c) Mutations de MET

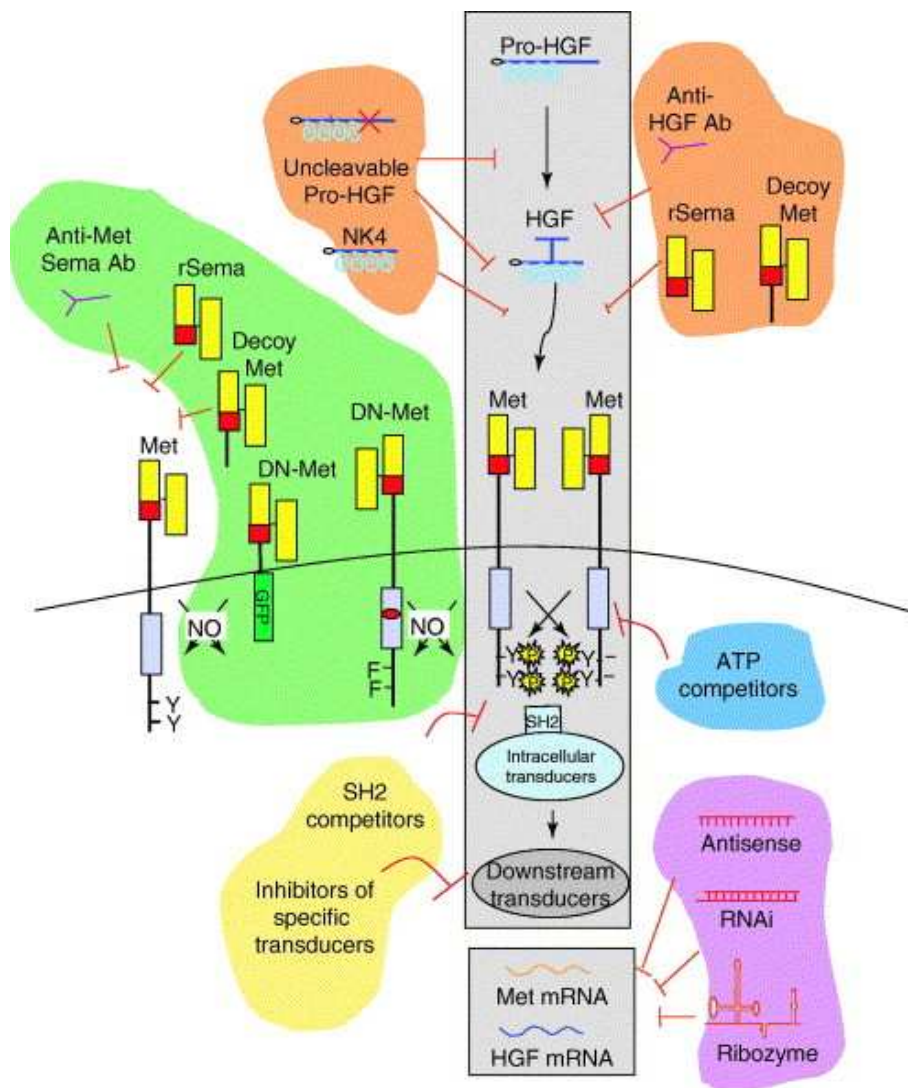
Le séquençage du gène de MET des membres d'une même famille affectés par un cancer papillaire rénal héréditaire a conduit à l'identification de mutations ponctuelles dans la séquence du domaine tyrosine kinase de MET, qui sont responsables de cette forme héréditaire de cancer. Celle-ci avec d'autres mutations ponctuelles ont ensuite été identifiées dans la séquence de MET dans des cancers sporadiques, tels que l'hépatocarcinome chez l'enfant, le carcinome papillaire rénal, le carcinome gastrique, le carcinome des cellules squameuses de la tête et du cou. Dans ces dernières, il a été montré que ces mutations étaient sélectionnées durant la dissémination métastatique, et conféraient des propriétés invasives aux cellules (Di Renzo et al., 2000). Des études *in vitro* ont montré que les mutations de MET identifiées dans les cancers induisaient une augmentation de l'activité kinase du récepteur, mais que celui-ci était toujours dépendant de son ligand pour son activation complète (Chiara et al., 2003). En fait, on observe plus une diminution du seuil d'activation qu'une activation constitutive, à l'exception du mutant Y1253D (Y9D) (Cristiani et al., 2005). Enfin, une mutation conduisant à un « splicing » alternatif du domaine juxtamembranaire est corrélée au développement du cancer du poumon (Kong-Beltran et al., 2006). Toutes les mutations de MET retrouvées dans le cancer sont compilées dans le tableau 6.

Des travaux récents réalisés par knock-in dans des souris ont permis d'évaluer la tumorigénicité de chaque mutation, et de les comparer entre elles (Graveel et al., 2004; Graveel et al., 2005). Il est intéressant de noter que chaque mutation conduit à un profil différent de tumeur, ce qui suggère soit que chaque mutation affecte ses propres cibles cellulaires, soit que chaque mutation affecte distinctement l'activité du récepteur.

Enfin, une translocation chromosomique est responsable de la formation de l'oncogène TPR-MET, où le gène TPR sert d'élément de dimérisation à la région intracellulaire de MET, dépourvue de sa région juxtamembranaire inhibitrice. Ce réarrangement de gène, qui a permis la découverte du récepteur MET (Cooper et al., 1984), a été très rarement observé dans des cancers humains (Soman et al., 1991; Yu et al., 2000).

c. Thérapies anticancéreuses ciblées sur MET

Le couple HGF/SF-MET est donc largement impliqué dans le développement de cancers, et en particulier leur surexpression est souvent corrélée à un mauvais pronostic.



La zone grise montre l'activation physiologique du récepteur MET : le pro-HGF/SF est converti en HGF mature, qui peut lier le récepteur MET, induire sa dimérisation et l'activer. Les bulles oranges montrent les molécules qui agissent comme des antagonistes de l'HGF/SF, ou des neutralisants de l'HGF/SF. La bulle bleue illustre les stratégies qui visent à bloquer l'activité kinase de MET. La bulle jaune contient les inhibiteurs des voies de signalisation intracellulaires de MET. La bulle violette montre les stratégies qui visent à diminuer l'expression de MET ou de l'HGF/SF. La bulle verte illustre les stratégies qui empêchent la dimérisation du récepteur sauvage.

Figure 13 : Stratégies anticancéreuses ciblées sur MET

(d'après Corso S & al. 2005)

Ainsi, différentes thérapies anti-cancéreuses ont pour cible la signalisation induite par MET, avec le développement de drogues différentes. Certaines vont particulièrement empêcher l'interaction de MET avec son ligand, d'autres vont inhiber sélectivement l'activité kinase du récepteur, et d'autres enfin auront pour but de bloquer les interactions entre le récepteur et ses effecteurs intracellulaires (Fig. 13) (Corso et al., 2005).

i Inhibiteurs de la fixation de l'HGF/SF sur MET

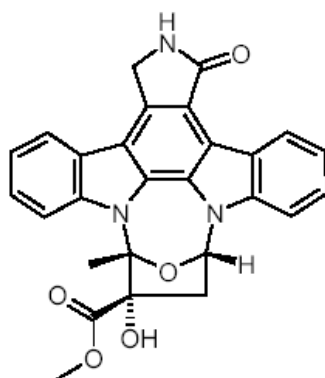
Bloquer la fixation du ligand est une stratégie thérapeutique logique pour une majorité de carcinomes, où l'activation paracrine et la surexpression de MET induisent l'activation de signalisation aberrante, ainsi que pour les mélanomes, glioblastomes et divers sarcomes, où la stimulation autocrine aberrante de l'HGF/SF induit la progression tumorale.

Les études structure/fonction ont permis de découvrir qu'une forme tronquée naturelle de l'HGF/SF (NK2) était un antagoniste compétitif spécifique, conduisant au développement de NK4, un fragment d'HGF/SF plus grand, et surtout plus antagoniste (Matsumoto and Nakamura, 2005; Son et al., 2006) ou à une forme non clivable de l'HGF/SF (Mazzone et al., 2004), capables tous deux de bloquer la croissance tumorale et l'apparition de métastases dans les modèles animaux. De la même manière, la génération de fragments extracellulaires solubles du récepteur MET possède des activités antitumorales en bloquant la signalisation dépendante et indépendante de l'HGF/SF (Kong-Beltran et al., 2004; Michieli et al., 2004). Des anticorps monoclonaux murins neutralisant dirigés contre l'HGF/SF humain ont été décrits pour être des agents anti-tumoraux efficaces dans des modèles animaux (Cao et al., 2001; Kim et al., 2006). Le développement récent d'un anticorps monoclonal humain neutralisant l'HGF/SF et possédant des propriétés anti-tumorales et son introduction en essai clinique de phase 1 est une importante avancée dans cette stratégie (Burgess et al., 2006) (http://wwwext.amgen.com/pipe_AMG102.html)

ii Inhibiteurs de l'activité kinase

L'autorisation de mise sur le marché de traitement de la leucémie myéloïde chronique, de tumeurs gastro-intestinales, et d'autres cancers par l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinases encourage fortement la recherche d'inhibiteurs spécifiques du récepteur MET. Les

K252a



Activité spécifique : ~30-100 nM

Compound	PHA665752	SU11274	SU11271	SU11606	Kirin
Structure					
Compound activity					
Assay	PHA665752 IC ₅₀ (µM)	SU11274 IC ₅₀ (µM)	SU11271 IC ₅₀ (µM)	SU11606 IC ₅₀ (µM)	Kirin IC ₅₀ (µM)
e-Met enzyme	0.009	0.01	0.04	0.17	0.008
HGF-stimulated e-Met phosphorylation	0.01	0.2	0.5	0.2	0.009
A549 cells					
HGF-stimulated cell viability	0.04	2.02	2.47	0.89	NA
BaPC3 cells					
HGF-stimulated cell scattering	0.04*	1.25*	2.5*	0.2*	NA
Compound selectivity					
Bcr Kinase	0.07	4	5.6	2.5	NA
EGFR	> 20	> 20	> 20	> 20	
PLXGFRb	> 20	> 20	> 20	> 20	
FGFR1	3	8.5	0.5	1.8	
Itk-1	0.2	1.25	1.28	0.18	
Trk2	> 100	> 100	> 100	> 100	
cdk2	> 10	> 10	> 10	> 10	

Tableau 7 : Efficacité et sélectivité de petites molécules inhibitrices de MET

(d'après Christensen JG & al. 2005)

premiers travaux s'intéressant à un alcaloïde dérivé de la staurosporine (K252a) ont montré qu'il pouvait inhiber l'autophosphorylation de MET, son activité mitogène, l'activation de AKT, et réverter le potentiel transformant de TPR-MET (Morotti et al., 2002). Néanmoins, cet inhibiteur possède une activité de l'ordre de 100 nanomolaire et est assez peu spécifique. Ainsi, des inhibiteurs synthétiques plus sélectifs de la fixation de l'ATP à MET ont été développés. Des molécules de type indolin-2-one (Tableau 7) sont efficaces à des concentrations de l'ordre du nanomolaire en culture cellulaire, et ont été testés dans différents systèmes (Christensen et al., 2005). Parmi ceux-là, les composés SU11274 et PHA665752 possèdent une sélectivité 50 fois plus grande pour MET que pour d'autres récepteurs tyrosine kinase, et bloquent l'activité de l'HGF/SF en culture cellulaire, ainsi que la tumorigénicité dans des modèles animaux (Christensen et al., 2003; Sattler et al., 2003). La sensibilité du SU11274 sur des cellules exprimant un récepteur MET mutant activé est différente selon la mutation considérée, ce qui suggère que les différents inhibiteurs pourraient être utilisés spécifiquement selon le type de cancer (Berthou et al., 2004), d'ailleurs les cancers gastriques avec une amplification du gène de MET ont une sensibilité plus grande pour le PHA665752 (Smolen et al., 2006). Ceci renforce le concept que la connaissance d'altération génétique devrait aider à prédire l'efficacité de certains inhibiteurs de MET pour des patients spécifiques. Au cours de ces 2 dernières années, de nombreuses compagnies pharmaceutiques ou de biotechnologies ont annoncé le développement de drogues ciblant le récepteur MET, dont certaines sont entrées en phase clinique :

XL880 démarre la phase 2 : <http://www.exelixis.com/pipeline.shtml#XL880>;

ARQ197 est en phase 1 : <http://www.arqule.com/res/pip/default.aspx>

Un autre en projet : <http://www.methylgene.com/content.asp?node=22>

iii Inhibiteurs de l'activation des voies en aval de MET

La nécessité du site de recrutement C-terminal, et le rôle des effecteurs impliqués tels que GAB1, PI3K, Grb2, Shc ou STAT3 pour l'activité transformante de MET suggèrent que cibler une ou plusieurs de ces interactions pourrait bloquer l'activité de MET. La connaissance de la structure du domaine SH2 de Grb2 a permis le développement de petits antagonistes sélectifs de Grb2 (Rahuel et al., 1996). Des adaptations de cette structure ont permis de générer des composés qui bloquent la motilité, l'invasion de la matrice, et la morphogénèse induite par l'HGF/SF (Atabey et al., 2001; Dharmawardana et al., 2006).

Différents produits ciblant les effecteurs des tyrosine kinases, tels que STAT3, AKT ou PI3K, sont aussi en cours de développement, il faudra ensuite vérifier leurs efficacités pour inhiber la signalisation induite par MET et l'HGF/SF. La geldanamycine, un composé qui lie et inhibe HSP90, bloque aussi l'activité oncogénique de MET, notamment en diminuant le niveau d'expression du récepteur MET (Shen et al., 2005; Webb et al., 2000; Xie et al., 2005). D'ailleurs, des études cliniques de phase 1 et 2 sont en cours sur des composés proches de la geldanamycine, sur une variété de cancers où MET ou l'HGF/SF sont actifs. En combinant des agents tels que la geldanamycine, qui diminue le niveau d'expression du récepteur MET à la membrane, avec des inhibiteurs spécifiques de la fonction des récepteurs, on pourrait diminuer la dose effective de chacun, diminuer leur toxicité, ainsi que la pression de sélection des mutations résistantes aux drogues.

D'autres stratégies anticancéreuses ciblées sur MET peuvent être également envisagées, telle que la diminution de l'expression de MET et/ou de l'HGF/SF, en utilisant des ARN antisens ou des ribozymes, amenés dans les cellules par des liposomes (Abounader et al., 2002; Jiang et al., 2003; Stabile et al., 2004). L'utilisation d'ARN interférence permet de diminuer complètement l'expression de MET *in vitro* et dans les modèles de tumorigenèse chez la souris (Shinomiya et al., 2004). Le principal obstacle d'une application clinique de cette approche est la faible efficacité des liposomes *in vivo*, même si la production de RNAi modifié chimiquement apporte de l'espoir pour une utilisation clinique (Soutschek et al., 2004). Une autre alternative est l'utilisation de dominants négatifs ou de récepteurs-leurre. Par exemple, un récepteur MET qui ne possède plus d'activité catalytique ou dépourvu de ses tyrosines C-terminales peut se dimériser avec un récepteur sauvage mais pas transduire de signaux (Firon et al., 2000; Furge et al., 2001). Le problème principal est l'acheminement de telles constructions jusqu'aux cellules tumorales, même si des avancées technologiques sont à prévoir dans ce domaine.

Néanmoins, la recherche d'inhibiteurs efficaces et sélectifs de la signalisation de MET reste un challenge thérapeutique important. Nul doute que prochainement un inhibiteur de MET sera disponible dans toutes les bonnes pharmacies.

6. MET et HGF/SF n'agissent pas seuls

L'interaction entre l'HGF/SF et MET permet l'activation du récepteur et le recrutement de nombreux partenaires. De plus, l'HGF/SF comme MET sont capable d'interagir indépendamment avec d'autres molécules, qui peuvent être importants pour appréhender la complexité de la signalisation du couple HGF/SF-MET. Je vais détailler ici les différents partenaires décrits pour ces deux molécules et leurs fonctions, j'ai choisi de les lister arbitrairement selon leur localisation (extra ou intracellulaire), et leur importance relative dans la signalisation de MET.

a. Les partenaires de l'HGF/SF

i Les glycoaminoglycanes

MET est le récepteur à haute affinité de l'HGF/SF ($K_D = 20-30 \text{ pM}$) (Mizuno and Nakamura, 1993). En plus du récepteur MET, l'HGF/SF est capable de se lier aux glycosaminoglycanes (GAG) tels que l'héparine ou l'héparane sulfate (HS) avec des affinités suffisamment élevées ($K_D : 0.2-20 \text{ nM}$) pour être compatibles avec une interaction physiologique (Lyon et al., 1998). L'héparine et l'héparane sulfate sont des polysaccharides linéaires chargés négativement, composés d'unités répétées de disaccharides modifiés de manière non-uniforme. L'héparine est un anticoagulant sanguin alors que l'héparane sulfate est retrouvé à la membrane cellulaire ou dans la matrice extra-cellulaire, attaché covalamment à différentes structures protéiques formant les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPGs). Leur degré de sulfatation diffère, l'héparine possédant plus de N- et de O-sulfatation que l'HS (Gallagher and Walker, 1985).

L'**héparane sulfate** peut être considéré comme un support pour l'HGF/SF, capable de concentrer le ligand à la surface cellulaire et d'augmenter les possibilités d'interaction avec son récepteur (Schlessinger et al., 1995), mais il pourrait également avoir un rôle plus spécifique. L'héparine est nécessaire à l'association de l'agoniste NK1 avec MET (Schwall et al., 1996), mais ne l'est plus pour la molécule entière d'HGF/SF tant *in vivo* que *in vitro* (Sakata et al., 1997). Néanmoins, l'héparine favorise le potentiel mitogénique de l'HGF/SF, et favorise l'oligomérisation de l'HGF/SF *in vitro*, ce qui pourrait faciliter la dimérisation de

MET et son activation (Zioncheck et al., 1995). Les GAGs peuvent être considérés comme des co-récepteurs importants pour l'activation de MET (Deakin and Lyon, 1999), et pourraient notamment être impliqués dans un complexe ternaire avec l'HGF/SF et MET (Lyon et al., 2002).

ii La nucléoline

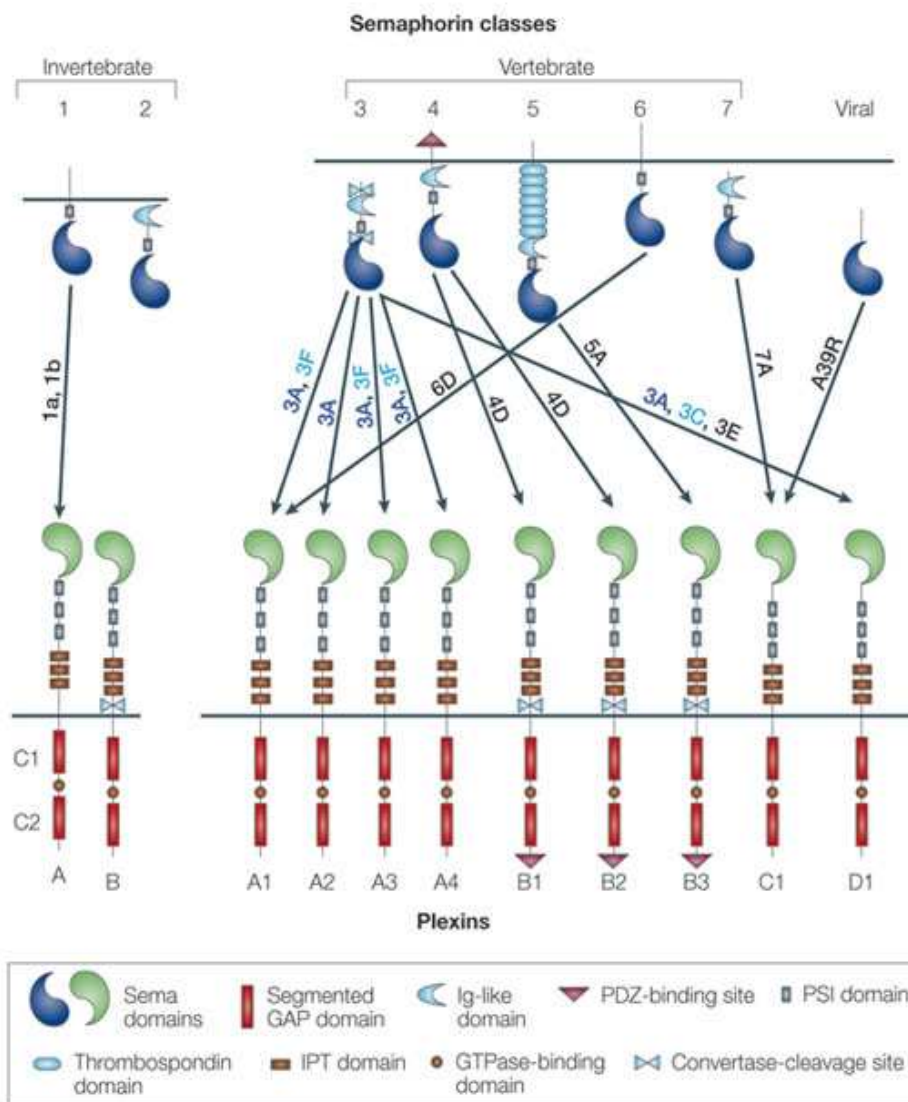
Très récemment, l'HGF/SF a été décrit pour induire la dispersion de cellules prostatiques dépourvues de récepteur MET. Les auteurs ont montré que l'HGF/SF pouvait interagir avec la **nucléoline** (ou C23) (Tate et al., 2006). La nucléoline tire son nom de sa localisation principale, puisqu'elle représente 10% de l'ensemble protéines du nucléole (Bugler et al., 1982). Elle a également un rôle de navette entre le cytoplasme et le noyau (Borer et al., 1989). De plus, elle est retrouvée à la surface de nombreux types cellulaires, où elle peut interagir avec des partenaires (Larrucea et al., 1998; Take et al., 1994). La nucléoline est impliquée dans la prolifération cellulaire, et est notamment une cible du récepteur à l'androgène (Derenzini et al., 1995; Tawfic et al., 1994).

La localisation membranaire de la nucléoline est corrélée à des tumeurs invasives (Mi et al., 2003). D'ailleurs, des inhibiteurs de la nucléoline (AGRO100) sont actuellement en phase 1 d'étude clinique. L'interaction semble dépendante de la liaison de l'héparine avec l'HGF/SF, et permet l'activation de petites protéines G. Bien que ce résultat soit à confirmer, il pourrait être une évidence de l'activité de l'HGF/SF indépendante du récepteur MET.

b. Les partenaires extra-cellulaires de MET

i Les sémaphorines et les plexines

Le récepteur MET fait partie de la famille des sémaphorines et des plexines, au regard de la conservation de leurs séquences extra-cellulaires (Fig. 3). Les sémaphorines sont une grande famille de protéines secrétées ou associées à la membrane plasmique. Plus de 20 membres ont été décrits, que l'on peut classer en 8 sous-familles, selon des considérations structurelles ou de similarités de séquences. Les récepteurs à sémaphorines sont les plexines,



Les flèches indiquent les interactions détectées entre les sémaphorines et les plexines. Les commentaires sur les flèches indiquent quels types de sémaphorine s'associe à quel plexine. Les commentaires en bleu indiquent ceux qui nécessite la présence de neuropilin-1 (bleu foncé) ou de neuropilin-2 (bleu clair) comme co-récepteurs.

Fig. 15 : Sémaphorines et plexines

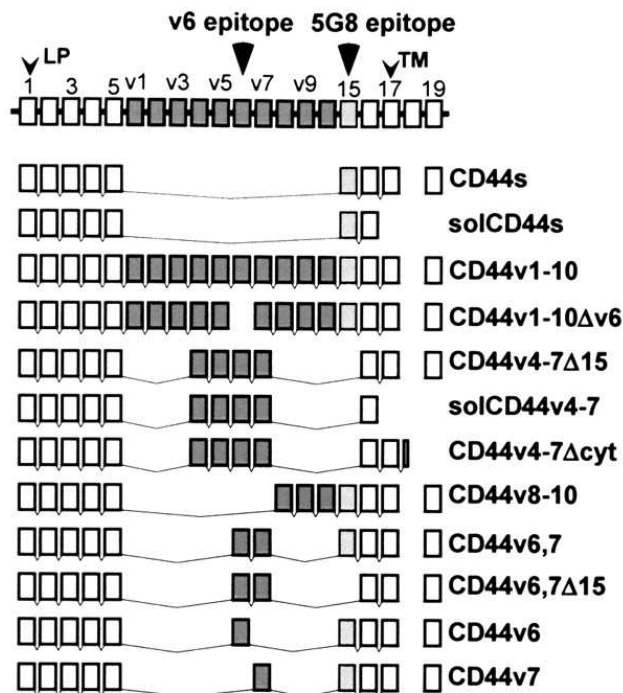
(d'après Kruger RP & al., 2005)

qui s'associent via leurs domaines SEMA, à l'exception de la classe 3 de sémaphorines, qui requiert la présence de neuropilines comme un co-récepteur pour activer les plexines (Kruger et al., 2005) (Fig. 15). Chez l'homme, il existe au minimum 9 gènes codant des plexines classées en quatre sous-familles selon leurs identités de séquences. Outre leur domaine SEMA extracellulaire qu'elles possèdent en commun avec les sémaphorines, MET et RON, leur partie intracellulaire comprend une région qui possède des homologies avec le domaine GAP de p120 Ras-GAP, qui est hautement conservé entre les différentes plexines, nommé GTPase binding domain. Il est admis que l'interaction entre sémaphorines et plexines lève l'autoinhibition de la plexine, car la plexine A1 déléetée du domaine SEMA est constitutivement active (Takahashi and Strittmatter, 2001). Suite à l'activation par les sémaphorines, les plexines deviennent phosphorylées sur des résidus tyrosines dans leur région intracellulaire, via des kinases de la famille de Src, et activent la signalisation via des petites protéines G (Rac, Rho, R-Ras ...) ou par la voie PI3K-AKT (Basile et al., 2005). D'une manière générale, les sémaphorines et les plexines sont impliqués dans les interactions cellulaires et régulent la motilité et l'attachement des cellules dans la guidance des axones, la croissance des vaisseaux, la réponse immunitaire et la progression tumorale (Kruger et al., 2005).

En plus de leur importante homologie, et de leur effets biologiques souvent comparables (Trusolino and Comoglio, 2002), il a été montré que le récepteur MET pouvait s'associer avec la **plexine B1**, indépendamment de leurs ligands respectifs, et que la fixation du ligand de la plexine B1, **Sema 4D**, induisait l'activation de la kinase MET et la phosphorylation des deux récepteurs sur des résidus tyrosines (Giordano et al., 2002). L'activation de MET par Sema 4D conduit à accroître le caractère invasif des cellules (Conrotto et al., 2004), ainsi que l'angiogénèse (Conrotto et al., 2005).

ii **CD44**

C'est à la surface des lymphocytes T que l'antigène CD44 a été décrit pour la première fois. CD44 représente une famille de glycoprotéines transmembranaires de type 1, récepteurs de l'acide hyaluronique, qui est un composé majeur de la matrice extracellulaire. La diversité de cette famille résulte, d'une part, de l'épissage alternatif de 10 exons, situés au centre du gène, désignés « variants ». L'expression différentielle de ces variants explique l'importante diversité de la partie extracellulaire de la molécule (plus de 20 isoformes ont déjà été



Représentation schématique des structures des isoformes de CD44. Les régions constantes sont 1-5 et 15-19, les variants v1-v10. LP = Leader peptide (peptide signal); TM = région transmembranaire.

(d'après Orian-Rousseau V. & al., 2002)

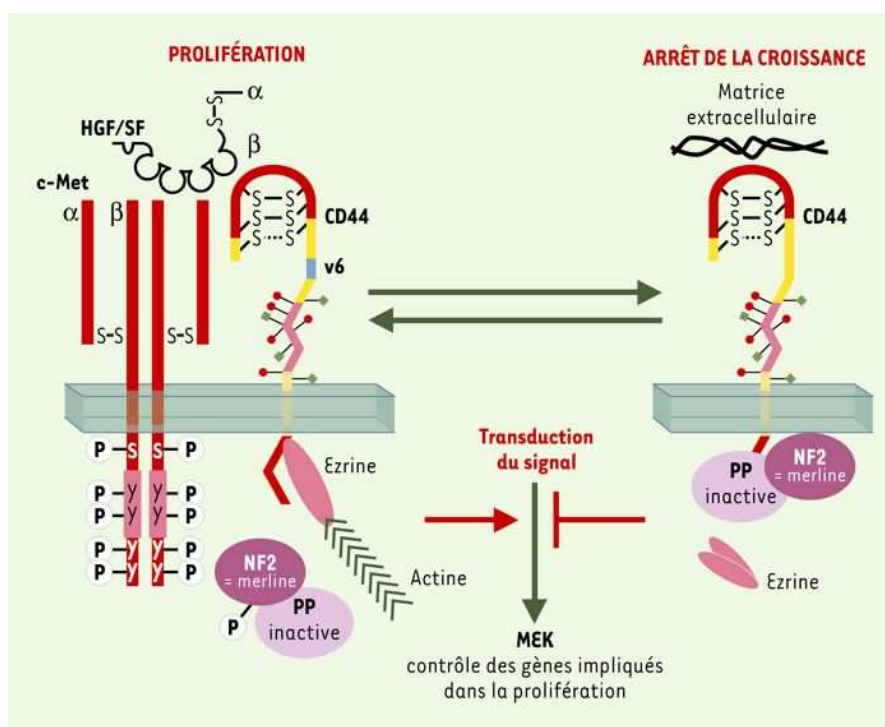


Schéma illustrant le rôle de CD44, promoteur ou inhibiteur de la croissance et de l'invasion cellulaires. Pour promouvoir la croissance et l'invasion des cellules, CD44 s'associe aux récepteurs de facteurs de croissance et à leur ligands (ici Met et HGF). L'activation du récepteur n'est possible qu'au sein de ce complexe. La propagation du signal vers les cibles cytoplasmiques nécessite le cytosquelette et se fait par l'intermédiaire des protéines ERM. Dans le cas inverse où CD44 inhibe la croissance et l'invasion cellulaire, CD44 se lie à l'acide hyaluronique. Cela a pour conséquence l'activation du suppresseur de tumeur - la merline - qui est alors déphosphorylée. Sous cette forme, la merline se lie à CD44 à la place des protéines ERM et bloque la transduction du signal et par conséquent la prolifération des cellules. ERM: ezrin-radixin-moesin;

(d'après Orian-Rousseau V., 2003)

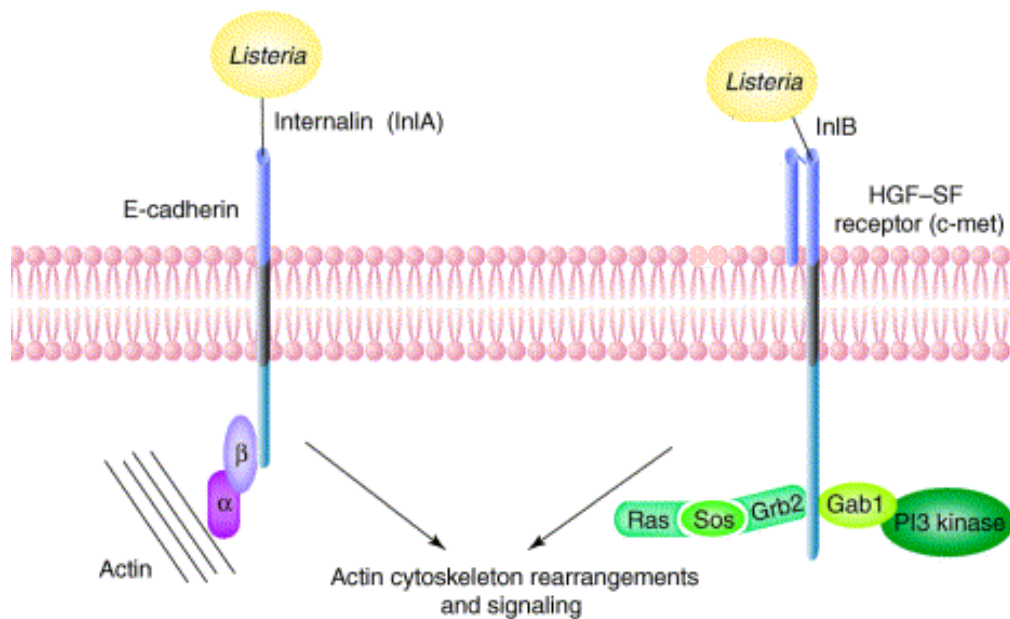
Fig. 16 : CD44 interagit avec MET et l'HGF/SF

identifiées) (Fig. 16). De multiples modifications post-traductionnelles, correspondant principalement à des N- et O-glycosylations et à l'ajout de chondroïtine sulfate, contribuent aussi à la variabilité protéique au sein de cette famille. La plus petite isoforme, dépourvue de variant, est appelée CD44 « standard » et est exprimée dans la plupart des tissus. En revanche, l'expression des isoformes contenant des variants caractérise certains tissus à renouvellement rapide, comme la peau. En pathologie, en particulier dans les cancers, l'expression des variants est déterminante pour le développement de la maladie (Orian-Rousseau, 2003).

La première découverte du rôle de CD44 dans la signalisation de MET a été montrée par l'isoforme v3-10, qui est capable de lier l'héparane sulfate. Le CD44v3-10 modifié par l'héparane sulfate favorise l'interaction entre l'HGF/SF et MET, et l'activation de la signalisation de MET (van der Voort et al., 1999). Il a ensuite été montré que le variant 6 de CD44 (**CD44v6**) interagit directement avec le récepteur MET, ce qui permet l'activation de MET par l'HGF/SF. En effet, des anticorps dirigés contre CD44 bloquent cette activation (Orian-Rousseau et al., 2002). Il a également été montré que CD44 était nécessaire à la formation d'un complexe ternaire comprenant MET et l'HGF/SF, et que la partie cytoplasmique de CD44 était nécessaire à la transmission du signal du récepteur. CD44v6 agirait donc comme un co-récepteur de MET pour l'HGF/SF (voir Fig. 16). Sachant que le variant v6 de CD44 est surexprimé dans de nombreux types de tumeurs humaines, mais aussi confère des propriétés métastatiques et invasives aux lignées cellulaires qui l'expriment, un rôle de cette interaction dans les cancers n'est pas à exclure. Il a été également montré qu'une petite portion à l'intérieur de l'exon v6 de CD44 était nécessaire à l'activation de MET par son ligand, et qu'un peptide de 5 acides aminés minimum contenant cette séquence (RWH chez l'homme) peut servir de compétiteur et bloquer l'activation de MET par son ligand (Matzke et al., 2005).

iii L'internaline B

Listeria monocytogenes est une bactérie Gram-positive pathogène, agent étiologique de la listériose, une infection alimentaire qui affecte préférentiellement les personnes immunodéprimées, les femmes enceintes et les nouveau-nés. La listériose provoque des gastro-entérites ainsi que des infections fœto-placentaires et du système nerveux central (Vazquez-Boland et al., 2001). Ces différents symptômes sont dus à la capacité de *Listeria* de



Sur la gauche, l'internalin A (InIA) interagit avec le domaine extracellulaire de la E-Cadhérine, dont le domaine intracytoplasmique interagit avec la β -caténine (β), qui lui même interagit avec la α -caténine (α), qui le tient au réseau d'actine. Sur la droite, les 2 ligands de l'internaline B (InIB) sont représentés.

Fig. 17 : Schéma de l'interaction de *Listeria monocytogenes* avec des cellules mammifères. (d'après Cossart P., 2001)

traverser de nombreuses barrières durant l'infection, telles que l'intestin, la barrière hémato-encéphalique et le placenta (Lecuit, 2005). Comme d'autres bactéries invasives, *Listeria* utilise des protéines de surface pour entrer en contact avec des récepteurs cellulaires de l'hôte, afin de permettre son internalisation. Une fois internalisée, *Listeria* s'échappe de la vacuole d'internalisation en sécrétant une toxine bactérienne nommée listeriolysin O (LLO) et utilise le réseau d'actine pour se mouvoir à l'intérieur du cytoplasme (Gouin et al., 2005). Une analyse génétique a permis l'identification des deux protéines majeures responsables de l'infection de cellules mammifères non phagocytaires par *Listeria* : l'internaline (InlA) et l'internaline B (InlB) (Dramsı et al., 1995; Gaillard et al., 1991). Les cibles cellulaires principales de ces 2 protéines ont été identifiées : la E-cadhérine pour InlA (Mengaud et al., 1996) et le récepteur MET pour **InlB** (Cossart, 2001; Shen et al., 2000) (Fig. 17). La génération de mutants déficients en InlA ou InlB a montré que chaque protéine est suffisante pour une infection efficace (Braun et al., 1998; Lecuit et al., 1997).

La protéine InlB de *Listeria* et l'HGF/SF n'ont en commun aucune homologie structurale, mais InlB induit une activation plus puissante de la voie RAS-ERK comparée celle induite par l'HGF/SF (Copp et al., 2003), et n'entre pas en compétition avec la fixation de l'HGF/SF (Shen et al., 2000). Cependant, InlB est capable d'induire les mêmes cascades d'activation de protéines, et les mêmes changements de la morphologie cellulaire, démontrant une parfaite adaptation bactérienne aux fonctions cellulaires (Bonazzi and Cossart, 2006). L'interaction de InlB avec MET permet l'activation du récepteur et son internalisation via des « clathrin coated pits », et de fait permet l'internalisation de la bactérie par détournement de la voie d'internalisation de MET et de l'HGF/SF (Veiga and Cossart, 2005).

c. Les récepteurs partenaires de MET

D'autres récepteurs ont été montrés pour interagir avec le récepteur MET. Néanmoins, le site d'interaction n'a pas été décrit, et nous ne pouvons affirmer si l'interaction est intra- ou extra-cellulaire. C'est pourquoi je les place dans un paragraphe séparé.

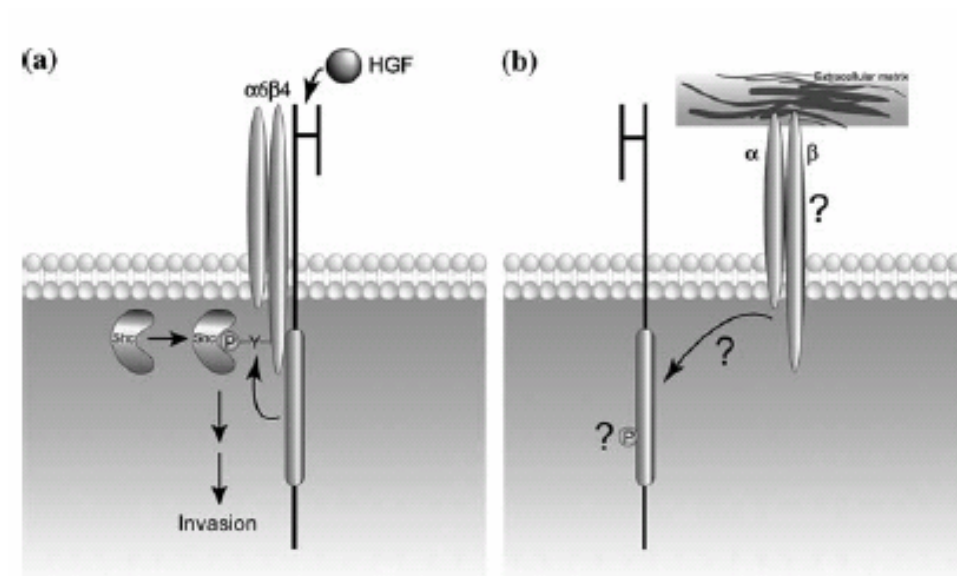
i RON : le plus proche parent de MET

Le récepteur MET est le prototype d'une famille de récepteurs tyrosine kinases, où il se trouve en compagnie de RON, son plus proche parent. Le récepteur RON (« Récepteur d'Origine Nantais ») présente 37% d'identité de séquences avec MET, il est l'homologue de c-Sea chez le poulet et Stk chez la souris (Wahl et al., 1999), qui sont les récepteurs du facteur de croissance MSP (Macrophage-stimulating protein) de leur espèce (Gaudino et al., 1994; Wang et al., 1994). RON a une fonction importante dans le développement comme en témoigne la mort embryonnaire au jour 6,5 des souris knock-out $RON^{-/-}$, alors que les souris hétérozygotes $RON^{+/-}$ atteignent l'âge adulte normalement, à l'exception d'une réponse inflammatoire inappropriée (Muraoka et al., 1999; Waltz et al., 2001). Le récepteur RON est exprimé dans de nombreux types de cellules épithéliales, ainsi que dans les macrophages, les cellules souches de moelle osseuse et les ostéoclastes (Gaudino et al., 1995; Iwama et al., 1995). L'activation de RON par son ligand MSP induit des voies de signalisation capables d'activer l'adhésion, l'invasion et la motilité, la transition épithélium-mésenchyme, et inhiber l'apoptose et l'anoïkis (Camp et al., 2005). Enfin, la surexpression de RON ou de son ligand MSP a été décrite dans différents types de carcinomes, ainsi que des mutations du récepteur induisant des variants de splicing, qui augmentent le potentiel métastatique des tumeurs (Zhou et al., 2003). D'ailleurs, le récepteur aviaire Sea a été initialement découvert grâce à son homologue viral v-sea formé par la fusion de la partie intracellulaire de Sea avec une protéine d'enveloppe du virus S13 de l'érythroblastose aviaire (Hayman et al., 1985).

Il a été montré que **RON** pouvait coopérer avec MET (Follenzi et al., 2000), ce qui pourrait augmenter leur potentiel métastatique (Maggiara et al., 2003). La co-expression des deux récepteurs est retrouvé dans certains cancers, ce qui est un facteur de mauvais pronostic (Cheng et al., 2005; Lee et al., 2005). De plus, un inhibiteur peptidique extracellulaire issu des travaux sur CD44v6 est capable d'inhiber les deux récepteurs (Matzke et al., 2005).

ii Le récepteur à l'EGF.

MET peut aussi interagir avec d'autres récepteurs tyrosine kinase, comme le **récepteur à l'EGF**. Quand le récepteur à l'EGF est surexprimé dans des cellules tumorales, il peut s'associer à MET et le phosphoryler (Jo et al., 2000). Il peut également l'activer



(a) En réponse à la stimulation par l'HGF/SF, l'intégrine $\alpha6\beta4$ s'associe physiquement à MET, et devient phosphorylé sur des résidus tyrosine du domaine cytoplasmique de $\beta4$, ce qui permet la formation d'un complexe avec Shc et PI3K, et permet l'activation des voies de signalisation Ras et PI3K.

(b) Activation de MET par l'adhésion cellulaire indépendante du ligand. Néanmoins, la spécificité de l'intégrine et le mécanisme responsable de cette activation reste indéterminé.

Fig. 18: Interaction entre MET et l'intégrine $\alpha6\beta4$

(d'après Chan PC et al., 2006)

indirectement, via la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui inhibe les tyrosine phosphatases ce qui induit l'activation de MET (Fischer et al., 2004).

iii Fas, le récepteur de mort

Fas (APO-1/CD95) est un récepteur membranaire, appartenant à la grande famille des récepteurs au TNF (tumor necrosis factor). Ce récepteur est exprimé dans de nombreux types cellulaires, et l'activation de Fas par oligomérisation permet le recrutement de l'adaptateur FADD et de la caspase-8, une caspase initiateur, formant le « death inducing signaling complex » (DISC) ou complexe de signalisation induisant la mort (Kischkel et al., 1995).

Il a été montré que le récepteur MET s'associe à **Fas** dans des hépatocytes, et le séquestre pour prévenir de l'association avec son ligand et de son oligomérisation, inhibant son activation et l'induction de l'apoptose (Wang et al., 2002b). Peu de travaux ont suivi ce résultat princeps, mais cette même interaction a ensuite été retrouvée dans des cellules endothéliales (Smyth and Brady, 2005), interaction qui permettrait de contrôler la sensibilité à Fas dans ces cellules.

iv Intégrine $\alpha\beta4$

L'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire est nécessaire à la prolifération et à la survie (Frisch and Ruoslahti, 1997). Les effets de la matrice extracellulaire sur les cellules sont principalement médiés par les intégrines, une grande famille de récepteurs membranaires qui peuvent s'associer aux composants de la matrice extracellulaire, organisent le cytosquelette et activent des voies de signalisation intracellulaire. Chaque intégrine est composée de deux sous-unités : α et β . Chez les mammifères, 18 sous-unités α et 8 sous-unités β s'associent dans des combinaisons variées pour former 24 intégrines, qui peuvent s'associer à des protéines de la matrice extracellulaire différentes, quoique parfois redondantes (Giancotti and Ruoslahti, 1999; Hynes, 2002). La plupart des intégrines activent FAK (Focal adhesion kinase) qui interagit avec de nombreuses molécules de signalisation, telles que les kinase de la famille Src, PI3K, phospholipase C γ 1, Grb2, p130Cas et la paxilline (Mitra et al., 2005; Parsons, 2003). FAK joue un rôle pivot dans le contrôle des fonctions

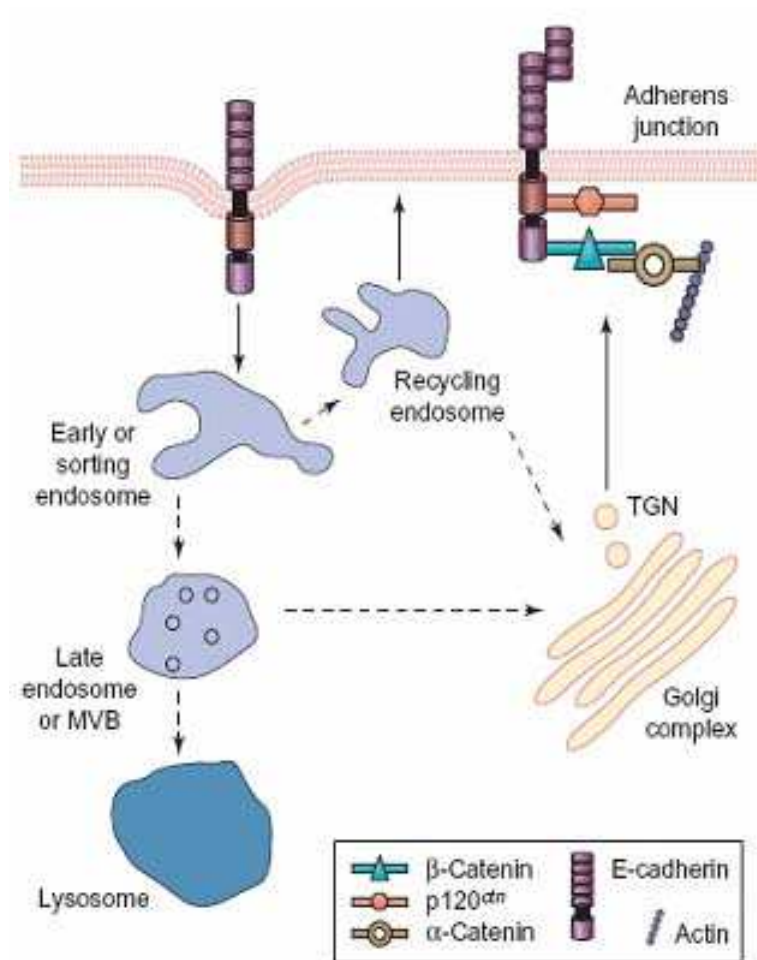


Fig. 19 : E-cadhérine et β -caténine

(d'après Bryant DM et Stow JL, 2004)

cellulaires induites par les intégrines, telles que la migration cellulaire, la prolifération et la survie.

L'**intégrine $\alpha6\beta4$** coopère avec les fonctions de l'HGF/SF et de son récepteur MET dans des cellules de carcinomes, induisant une augmentation du caractère invasif de ces cellules (Trusolino et al., 2001). En réponse à l'activation de MET, l'intégrine $\alpha6\beta4$ interagit avec MET ce qui induit la phosphorylation sur des résidus tyrosine du domaine cytoplasmique de $\beta4$, qui peut former un complexe avec Shc et PI3K, activant les voies de signalisation de Ras et de PI3K (Chan et al., 2006) (Fig. 18a). L'intégrine $\alpha6\beta4$ est la seule intégrine à contenir un domaine cytoplasmique très long, possédant des sites de recrutement de Shc, amplifiant ainsi la signalisation de MET. Le domaine extracellulaire de $\beta4$ n'est pas nécessaire à l'interaction avec le récepteur MET activé, suggérant un rôle indépendant de l'adhésion pour cette intégrine. La sous-unité $\beta4$ de l'intégrine est donc proposée pour être un servo-oncogène, c'est-à-dire un complice de signalisation du récepteur MET (Bertotti et al., 2005). La collaboration fonctionnelle entre $\beta4$ et MET est corroborée par l'observation que les deux molécules sont surexprimées concomitamment dans les mêmes types de tumeurs (Mercurio and Rabinovitz, 2001).

De plus, il a été montré que le récepteur MET peut être activé par l'attachement cellulaire dans certaines cellules cancéreuses, vraisemblablement par des intégrines, en absence complète d'HGF/SF (Wang et al., 2001; Wang et al., 1996) (Fig. 18b). La surexpression de MET apparaît comme un pré-requis pour son activation par l'adhésion cellulaire. Ni l'intégrité du cytosquelette d'actine, ni l'activation de FAK ne semblent être requises pour activer MET de cette manière. De plus, le type d'intégrine ainsi que le mécanisme responsable de l'activation sont inconnus.

v *E-cadhérine et β -caténine*

La E-cadhérine, qui est le membre prototype de la famille des cadhérines, est un composé majeur des jonctions adhérentes, où il permet l'adhésion cellule-cellule grâce à l'interaction de deux molécules sur deux cellules épithéliales adjacentes. Dans les jonctions adhérentes, la E-cadhérine est liée aux caténines par sa région intracellulaire. La β -caténine s'attache à la région C-terminale de la E-cadhérine, ainsi qu'à la α -caténine, qui permet l'accrochage du complexe au cytosquelette d'actine (Fig. 19) (Bryant and Stow, 2004).

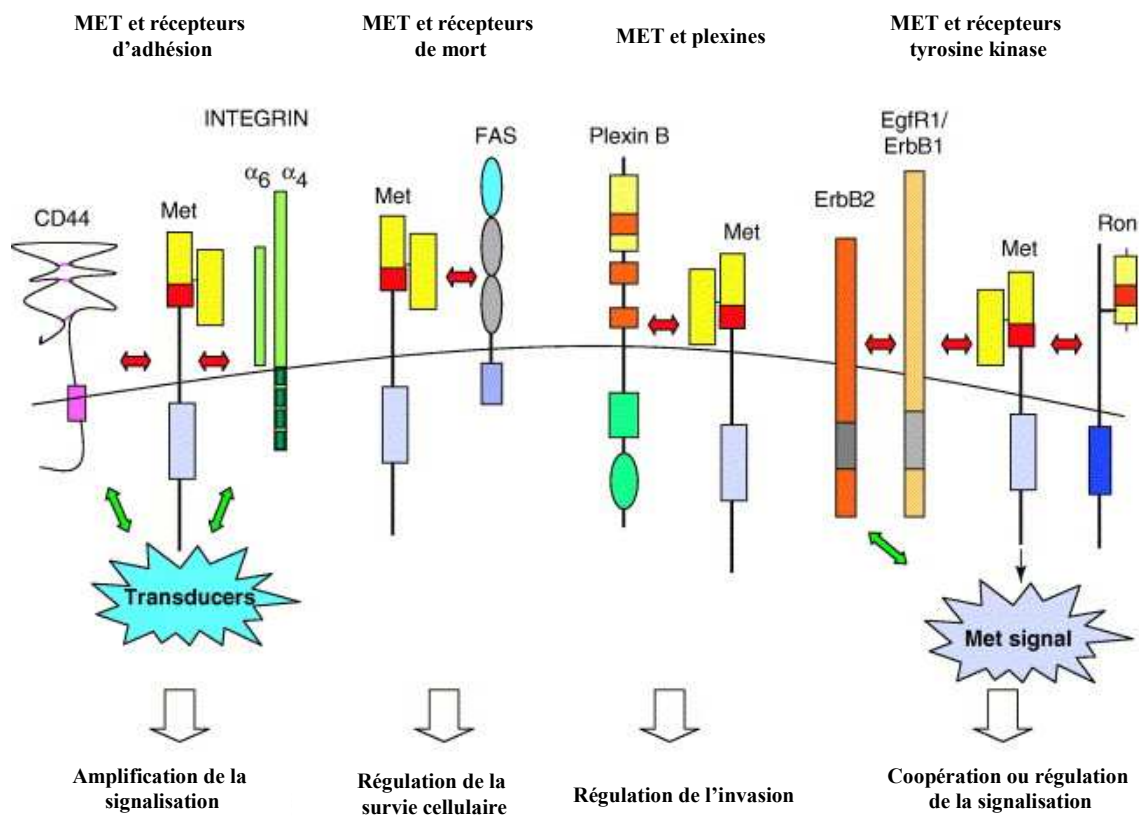


Fig. 20: Interaction entre MET et d'autres récepteurs

(d'après Corso S. et al., 2005)

Plusieurs études ont montré des relations entre MET et la E-cadhérine. L'activation de cellules épithéliales par l'HGF/SF induit la dissociation des jonctions adhérentes dépendante de l'E-cadhérine, et la co-endocytose de l'E-cadhérine avec MET (Hiscox and Jiang, 1999; Kamei et al., 1999). La stimulation par l'HGF/SF induit l'activation des MAPK et la phosphorylation de la β -caténine (Liou et al., 2002), induisant la dissociation de la β -caténine avec l' α -caténine et libérant la β -caténine de la membrane plasmique (Brembeck et al., 2004). Ceci conduit à la dissociation de la E-cadhérine avec le cytosquelette, permettant l'ouverture des jonctions adhérentes (Pece and Gutkind, 2002). Enfin, une interaction de MET avec la β -caténine a également été montrée comme indépendante de la E-cadhérine (Monga et al., 2002). L'activation de MET par l'HGF/SF induit la dissociation de MET et de la β -caténine, la phosphorylation de deux résidus tyrosine de celle-ci, et sa translocation nucléaire (Zeng et al., 2006). De plus, une boucle d'activation entre ces deux partenaires pourrait favoriser la croissance de tumeurs colo-rectales (Rasola et al., 2006). La β -caténine est cruciale dans l'activation de la voie de signalisation Wnt (Willert and Jones, 2006), ce qui permettrait de lier la signalisation du couple MET-HGF/SF avec cette voie.

En conclusion, MET interagit avec différentes catégories de récepteurs cellulaires. Ces interactions régulent les effets de chaque récepteur, par inhibition ou coopération (voir Fig. 20)

d. Les partenaires intracellulaires de MET

La liaison de l'HGF/SF entraîne une dimérisation du récepteur MET, l'activation de son potentiel tyrosine kinase et une transautophosphorylation sur des résidus tyrosine. Le récepteur MET contient 16 tyrosines dans sa région intracellulaire qui sont numérotées de 1 à 16, de la région transmembranaire à la queue C-terminale (Fig. 21). Lorsqu'il est activé, MET s'autophosphoryle sur deux résidus tyrosine adjacents Y8 et Y9, localisés dans le domaine kinase. Ces deux résidus correspondent au site majeur d'autophosphorylation du récepteur (Ferracini et al., 1991) et sont conservés dans de nombreux récepteurs tyrosine kinase car indispensables à l'activité catalytique de ces récepteurs. Ainsi, la mutation de ces résidus abolit toute activité du récepteur MET (Longati et al., 1994).

L'activation de MET permet d'induire l'autophosphorylation d'autres résidus localisés dans la région C-terminale du récepteur. En particulier, les tyrosines Y14 et Y15, distants de 7

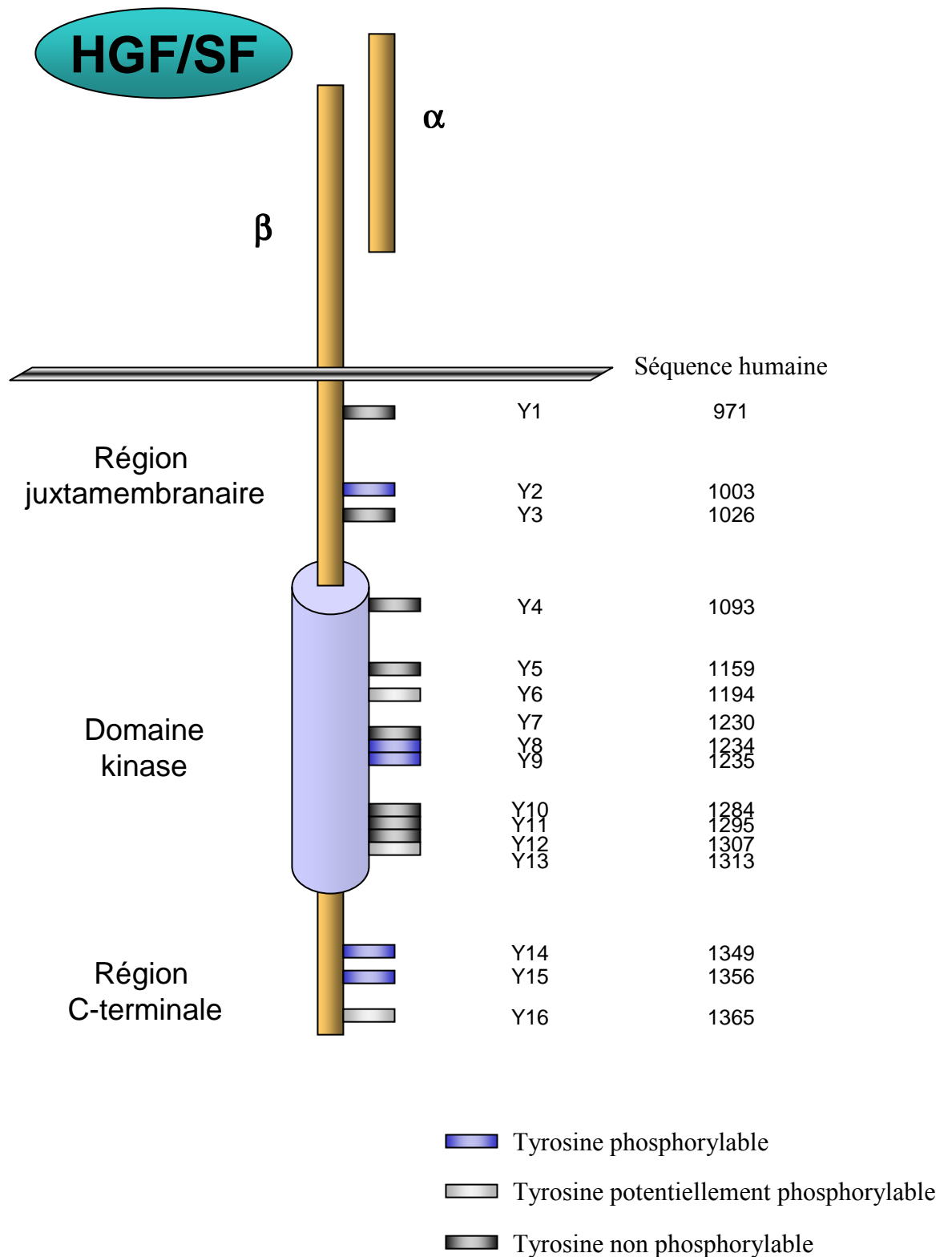


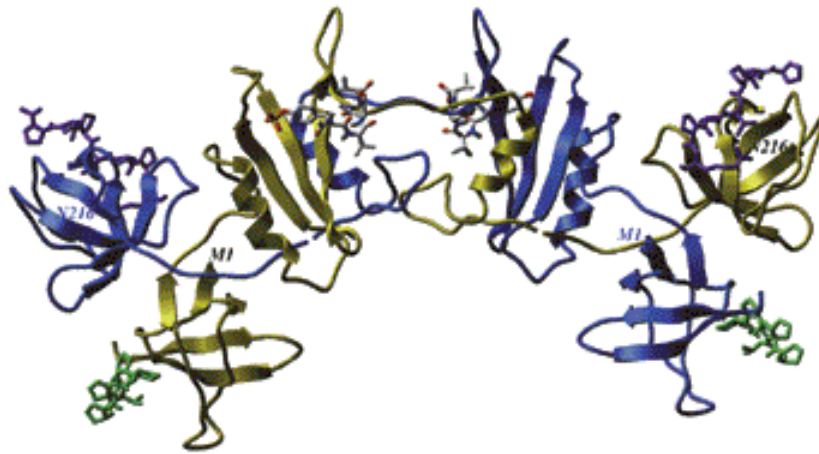
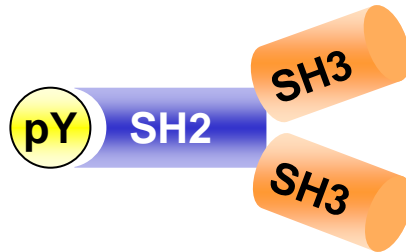
Fig. 21: Représentation schématique du récepteur MET humain.

acides aminés (Y¹⁴VHVNAY¹⁵VNV) sont très importants dans l'induction des réponses biologiques du récepteur (Ponzetto et al., 1994; Weidner et al., 1995). Les tyrosines Y14 et Y15 constituent le site de recrutement multisubstrat du récepteur, en interagissant avec des domaines SH2 (« Src homology 2 ») ou un domaine spécifique MBD (« MET binding domain) de Gab1. Le recrutement de la majorité des partenaires de MET sur un site d'ancrage unique est original dans la famille des récepteurs tyrosine kinase, qui recrutent plus souvent des partenaires via des sites distincts. Cette originalité laisse en suspens la question de la spécificité de substrat, puisqu'il est exclu que tous puissent interagir au même moment avec le récepteur MET activé. Néanmoins, le laboratoire a montré que des signaux peuvent être induits par l'HGF/SF sans ce site de recrutement multisubstrat, permettant d'affirmer que bien que responsable majeur de la signalisation de MET, il n'est pas l'unique voie de signalisation (Tulasne et al., 1999).

Une autre tyrosine importante est phosphorylée après l'activation du récepteur MET, il s'agit de la tyrosine Y2, localisée dans la région juxtamembranaire du récepteur, et dont la mutation entraîne une activation constitutive du récepteur, permettant de la classer comme une tyrosine inhibitrice (Weidner et al., 1995).

D'autres tyrosines de MET ont été montrées phosphorylables, comme la tyrosine Y6 (Cristiani et al., 2005), la tyrosine Y13, qui serait un site de fixation pour la PI3K ou la tyrosine Y16, située à l'extrémité C-terminale, serait importante pour la morphogenèse (Maulik et al., 2002).

Sur ces tyrosines phosphorylées vont venir s'accrocher différentes protéines importantes pour la signalisation du couple HGF/SF-MET, certaines ont pour fonction de recruter d'autres partenaires, ce sont des adaptateurs qui permettent d'amplifier le signal ou de l'orienter, et d'autres vont induire des voies de signalisation spécifiques. Enfin, il faut garder à l'esprit que des ces partenaires ne sont pas forcément exprimé ubiquitairement, que leur localisation subcellulaire est variable, et aussi que leur abondance relative peut être très différente. La signalisation induite par un récepteur MET activé va donc être largement tributaire du contexte cellulaire dans lequel il se trouve. Néanmoins, certains partenaires sont retrouvés de manière récurrente, alors que d'autres sont beaucoup plus rares.



Modèle du dimère de Grb2 entier, avec leurs peptides associés. Les extrémités N et C-terminale sont mentionnées (M1 et N216). La dimérisation s'effectue par un échange de domaine entre 2 SH2, conduisant à un dimère de molécules entrecroisés.

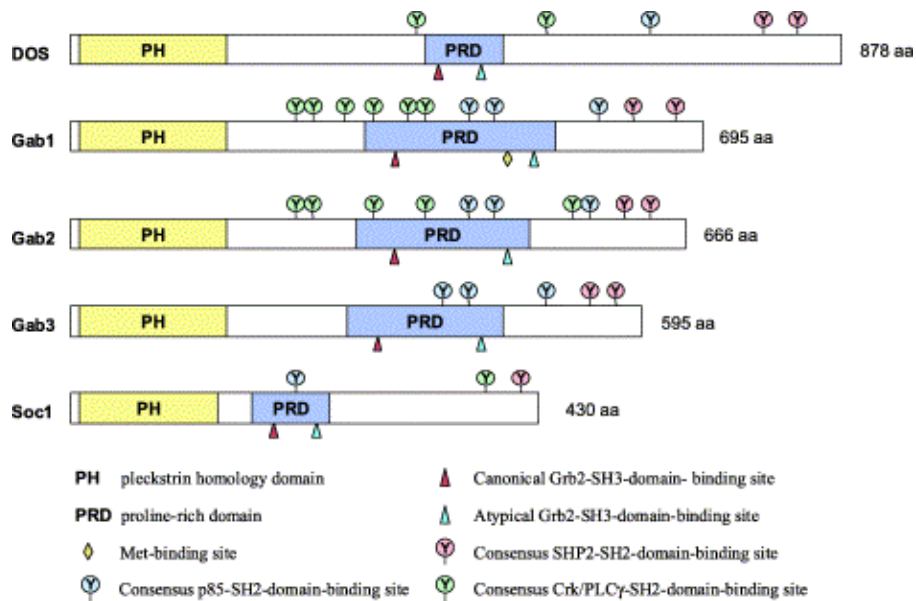
Fig. 22: Structure de Grb2

(d'après Schiering N. et al., 2000)

La protéine adaptatrice Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) est constituée d'un domaine SH2 (Src homology 2) central flanqué de deux domaines SH3 (Fig. 22). Le domaine SH2 de Grb2 reconnaît spécifiquement une phosphotyrosine à l'intérieur d'une séquence pYXNX (X pour n'importe quel acide aminé) (Songyang et al., 1994), alors que les domaines SH3 reconnaissent spécifiquement des séquences riches en proline de séquence PXXPXR (Goudreau et al., 1994; Terasawa et al., 1994). Grb2 est recruté par de nombreux récepteurs : des récepteurs tyrosine kinase comme l'EGFR (Garbay et al., 2000) ou MET (Ponzetto et al., 1996); des récepteurs de cellules hématopoïétiques comme le récepteur des lymphocytes T (T cell receptor) (Koretzky, 1997), le FcεR1 (Turner et al., 1995) ou le récepteur des cellules B (B-cell receptor) (Vihinen and Smith, 1996). De plus, Grb2 est impliqué dans les modifications du cytosquelette suite à l'adhésion des cellules (Schlaepfer et al., 1994). Les protéines adaptatrices telles que Grb2 ont pour fonction de recruter de nombreuses protéines au niveau de la membrane plasmique suite à l'activation du récepteur (Buday, 1999; Jordan et al., 2003). Grb2 permet l'activation de facteur d'échange de guanidine de Ras ou de la famille Rac/Rho, en s'associant avec les facteurs d'échange de nucléotides tels que Sos ou Vav (Garbay et al., 2000; Yuzawa et al., 2001).

La structure de Grb2 a permis de montrer que cette protéine est flexible avec un lien entre les domaines SH2 et SH3 très mobile (Yuzawa et al., 2001), de plus, elle semble s'organiser en une structure dimérique compacte avec un contact intermoléculaire entre deux domaines SH2 (Maignan et al., 1995; Schiering et al., 2000). En comparant la structure du domaine SH2 libre et celui en complexe avec un peptide pYVNV, il a été conclu qu'il existe des modifications de la structure entre une protéine Grb2 libre ou complexée (Nioche et al., 2002). De plus, l'association du domaine SH2 à un peptide phosphorylé induit un changement de conformation et réduit la flexibilité générale de la protéine (de Mol et al., 2004).

L'adaptateur Grb2 est capable de lier spécifiquement la Y15 de MET (YVNV), mais pas la Y14 (YVHV) et peut également être recruté par MET de manière indirecte via la phosphorylation des adaptateurs Shc ou Gab1. Ses fonctions principales sont de permettre le recrutement d'autres protéines, telles que Gab1 ou CBL (Bardelli et al., 1997; Fixman et al., 1997; Nguyen et al., 1997), mais aussi d'activer de la voie des MAPK (Ras-Raf-MEK-ERK) (Paumelle et al., 2002) par le recrutement du facteur d'échange Sos1, permettant l'activation de la petite protéine G Ras (Li et al., 1993).



Représentation schématique des domaines des protéines de mammifères Gab1, Gab2 et Gab3 (ici : murin), de la protéine de drosophile DOS, et l'orthologue de *C.elegans* Soc1. Toutes les protéines de la famille Gab sont constituées d'un domaine PH N-terminal, d'un PRD central et de multiples sites de tyrosines phosphorylables, souvent favorables à l'interaction avec des domaines SH2 (comme indiqué). Le domaine de liaison pour MET et Grb2 est également indiqué.

Fig. 23: Les protéines de la famille Gab

(d'après Liu Y. et Rohrschneider LR, 2002)

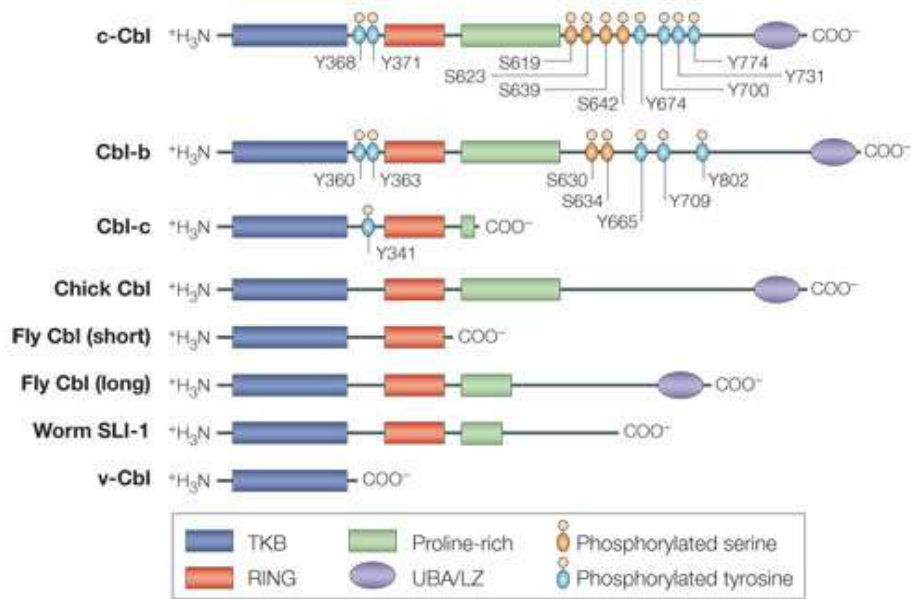
ii Gab1

Les protéines Gab (Grb2-associated binder) sont des membres de la famille des IRS (Insulin receptor substrate), avec trois membres de la famille chez les mammifères (Gab1, Gab2 et Gab3), un chez la drosophile (DOS) et un chez *C.elegans* (Soc1) (Liu and Rohrschneider, 2002) (Fig. 23). Chaque membre de la famille Gab présente de multiples motifs fonctionnels qui permettent l'interaction avec de nombreuses molécules de signalisation mais seul Gab1 peut interagir directement avec MET (Weidner et al., 1996).

Gab1 possède un site original de fixation à MET, appelé MBD (MET binding site), qui est distinct du site de fixation à Grb2 (Schaeper et al., 2000). Gab1 s'associe directement sur la Y14 du récepteur MET via son domaine MBD (MET binding domain) (Lock et al., 2003), et indirectement sur la Y15 via Grb2 (Lock et al., 2000). L'interaction permet la phosphorylation de nombreuses tyrosines de sa séquence permettant le recrutement de nombreux partenaires de signalisation tels que PI3K, PLC γ 1, SHP2 ou Crk (Schaeper et al., 2000). ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase) peut également s'associer au domaine MBD de Gab1 (Osawa et al., 2004), et phosphoryler la protéine sur des résidus sérines et thréonines pour moduler son activité (Lehr et al., 2004; Roshan et al., 1999), cela permet également la translocation de ERK1/2 dans le noyau, en utilisant le NLS (Nuclear localisation sequence) de Gab1, localisé dans sa région N-terminale (Osawa et al., 2004).

Gab1 contient un domaine PH (pleckstrin homology), localisé dans sa région N-terminale, qui permet la translocation de Gab1 à la membrane plasmique (Kameda et al., 2001). Il permet l'interaction avec des phospho-inositides, particulièrement le PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate), produit par la PI3K (Rodrigues et al., 2000). Des mutants de Gab1 tronqués du domaine PH, ou mutés sur des résidus nécessaires à l'interaction avec des phospho-inositides diminuent drastiquement la morphogénèse induite par MET (Maroun et al., 1999a; Maroun et al., 1999b), montrant que la localisation membranaire de Gab1 est importante pour la signalisation de MET. Le remplacement du domaine PH par un autre domaine de localisation membranaire tel que la séquence de myristoylation de Src, non régulée par PI3K, transforme la signalisation de l'EGF en programme invasif (Maroun et al., 2003).

Le rôle de Gab1 dans la signalisation induite par MET est très important, comme en témoigne les knock-out Gab1^{-/-} : des souris déficientes pour Gab1 présentent un phénotype



Représentation schématique des domaines des protéines de mammifères c-Cbl, Cbl-b et Cbl-c, ainsi que leurs orthologues et une forme virale.

Les membres de la famille Cbl possèdent dans leur région amino-terminale un domaine de liaison à une phosphotyrosine (TKB pour Tyrosine Kinase Binding), suivi d'un domaine RING qui permet l'interaction avec l'E2 ubiquitine ligase. La région riche en proline permet le recrutement de protéines à domaine SH3 et la région C-terminale contient un domaine associé à l'ubiquitine (UBA) qui chevauche un domaine Leucine zipper (LZ) qui permet l'oligomérisation de CBL. De plus, de nombreux sites de phosphorylation sur des résidus sérines ou tyrosines ont été décrits.

Fig. 24 : Les protéines de la famille Cbl

(d'après Schmidt M & Dikic I, 2005)

comparable aux souris déficientes pour MET ou l'HGF/SF, tel que une taille du foie réduite et un défaut de migration des cellules précurseurs de myoblastes (Itoh et al., 2000; Sachs et al., 2000). Il a une fonction de plate-forme de recrutement et permet d'activer des voies de signalisation que MET ne pourrait activer seul, ou d'augmenter leur durée d'activation. Par exemple SHP2 est essentiel pour la morphogenèse de branchement (Maroun et al., 2000; Schaeper et al., 2000), alors que l'interaction avec PI3K semble importante pour la protection contre l'apoptose (Fan et al., 2001; Holgado-Madruga et al., 1997). Gab1 est également nécessaire à la progression dans le cycle cellulaire et à la prolifération (Mood et al., 2006). Notons que Gab1 n'est pas spécifique du récepteur MET, il peut également être recruté par d'autres récepteurs tels que l'EGFR, le récepteur à l'insuline ou TrkA, le récepteur au NGF, mais toujours indirectement via Grb2 (Liu and Rohrschneider, 2002). La différence du mode de recrutement de Gab1 par ces récepteurs pourrait expliquer, au moins en partie, les différences de fonctions biologiques entre les récepteurs, en particulier, leur capacité à induire la morphogenèse des cellules épithéliales.

iii CBL

Les protéines de la famille CBL (Casitas B-cell lineage), c-Cbl, Cbl-b et Cbl-c, diffèrent par la longueur de leur région C-terminale, qui possèdent de nombreux sites de phosphorylation et donc a la capacité de recruter de nombreux partenaires (Fig. 24). c-Cbl et Cbl-b sont des protéines exprimées de manière ubiquitaire (Thien and Langdon, 2001) alors que Cbl-c, l'isoforme la plus courte, est majoritairement exprimé dans les cellules épithéliales. Le prototype c-Cbl consiste en un domaine TKB (Tyrosine kinase binding), localisé coté N-terminal, un motif RING finger, une région riche en proline et un domaine associé à l'ubiquitine (UBA) qui chevauche un motif leucine zipper (LZ), dans la région C-terminale. De plus, la molécule est riche en sites de phosphorylation sur des sérines ou des tyrosines, capables de recruter des protéines contenant des domaines SH2, en plus des domaines SH3 qui reconnaissent la région riche en proline. Ceci confère à c-Cbl la fonction de protéine adaptatrice ou de plate-forme (Schmidt and Dikic, 2005). Le domaine TKB et le domaine RING sont tous deux nécessaires pour l'activité E3 ubiquitine-ligase de CBL : le domaine TKB permet le recrutement de CBL à son substrat via une tyrosine phosphorylée, alors que le domaine RING s'associe avec l'enzyme de conjugaison E2 de l'ubiquitine (UbcH7). Enfin, la région C-terminale UBA/LZ a un rôle dans l'oligomérisation de CBL et l'association à

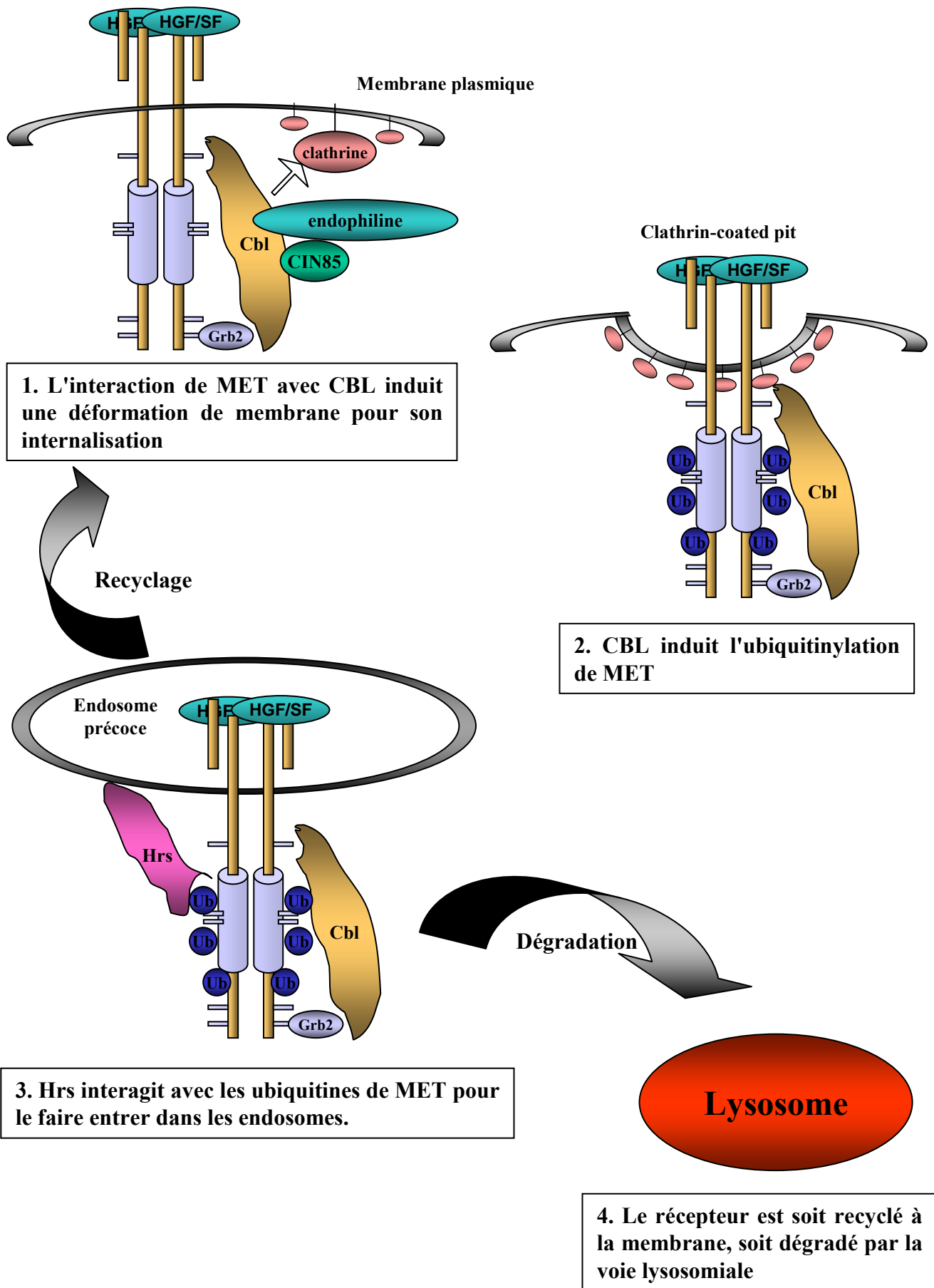
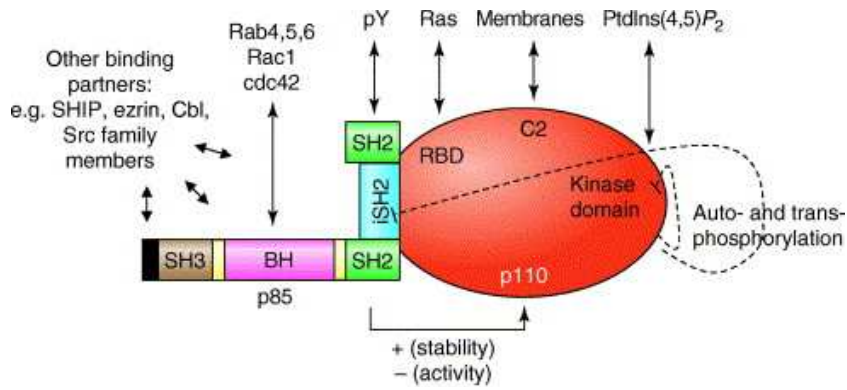


Fig. 25: Schéma simplifié de la voie de dégradation du récepteur MET activé.

l'ubiquitine. Pour de nombreux récepteurs tyrosine kinase, CBL est nécessaire à l'internalisation du récepteur activé, son ubiquitinylation ainsi que sa dégradation par des voies protéasome-dépendante ou indépendante. En résumé, CBL est une molécule multifonctionnelle, adaptatrice, plate-forme de signalisation, de plus capable de lier l'ubiquitine à ses substrats.

Le récepteur MET est capable de recruter CBL de deux manières distinctes, indirectement par son domaine de recrutement multisubstrat C-terminal via Grb2, et directement par la phosphorylation de la Y2 juxtamembranaire reconnue par le domaine TKB de CBL (Peschard et al., 2001), via une séquence DpYR (Peschard et al., 2004). Alors que le recrutement indirect de CBL permet sa phosphorylation, son recrutement direct via la Y2 est nécessaire à l'ubiquitinylation de MET (Peschard et al., 2001). La mutation de la tyrosine Y2 en phénylalanine, la rendant non phosphorylable, confère à MET un « gain de fonction » (Weidner et al., 1995), vraisemblablement dû au défaut d'interaction avec CBL (Peschard et al., 2001). Le récepteur MET activé va alors être internalisé, et CBL est la clé de voûte nécessaire à ce mécanisme en plusieurs étapes (Fig. 25). D'abord, le recrutement de CBL va permettre la formation d'un complexe entre MET, CBL, CIN85 et l'endophiline, qui va permettre les premières étapes de l'internalisation du récepteur dans des puits décorés de clathrine (« clathrin coated pits ») (Petrelli et al., 2002). Ensuite, c'est par l'intermédiaire de l'ubiquitinylation du récepteur, réalisée par CBL, que le récepteur MET va pouvoir recruter une protéine possédant un domaine d'interaction à l'ubiquitine (UIM) : Hrs (Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate) (Abella et al., 2005; Urbe et al., 2000; Urbe et al., 2003), qui va emmener le récepteur activé vers les endosomes. A ce jour, il semble que le récepteur MET ne va pas être dégradé par le protéasome suite à une polyubiquitinylation, comme précédemment rapporté (Jeffers et al., 1997b), mais il semblerait que MET soit poly-monoubiquitinylé (Carter et al., 2004), internalisé, puis soit recyclé à la membrane, soit dégradé par la voie lysosomiale (Abella et al., 2005). Ainsi, l'ubiquitinylation de MET est nécessaire à son trafic et sa dégradation qui semble protéasome-indépendante. Les effets observés par les inhibiteurs de protéasome, qui avait précédemment fait conclure à une dégradation de MET par le protéasome pourrait être dû à un manque d'ubiquitine libre dans les cellules traitées avec des inhibiteurs de protéasome, dû à la formation et à la non-dégradation de chaîne de poly-ubiquitines, empêchant l'ubiquitinylation du récepteur, et donc son trafic et sa dégradation (Belouzard and Rouille, 2006).



La sous-unité p85 stabilise la sous-unité p110, mais diminue son activité, cette inhibition peut être levée par l'engagement du domaine SH2 par une phosphotyrosine. (BH : Bcr/Ras GAP homology domain; iSH2 : inter SH2 domain; RBD : Ras binding domain; SH : Src homology domain.)

Régulation intermoléculaire des sous-unités p85 et p110 de PI3K (d'après Vanhaesebroeck & al., 2005)

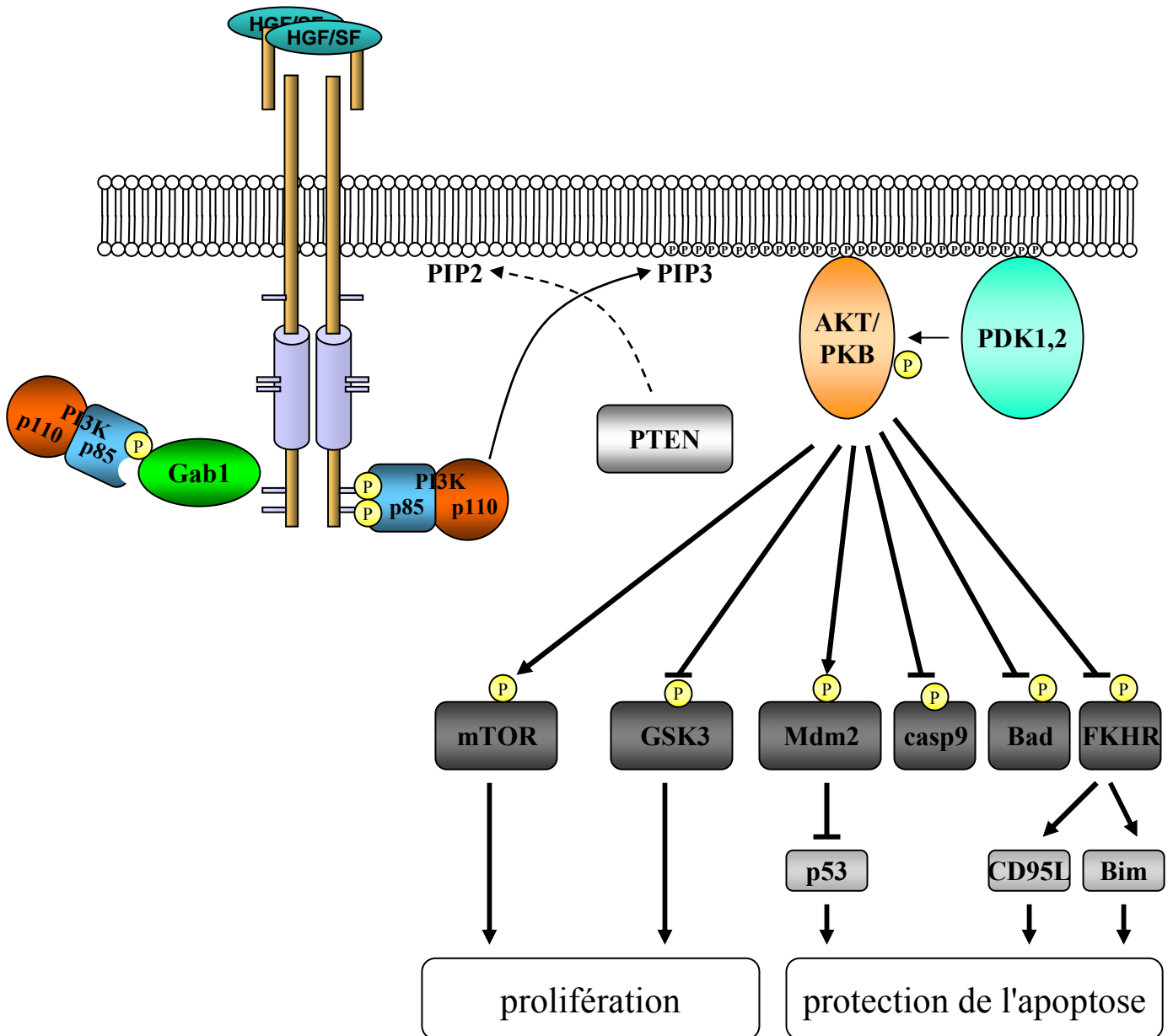


Fig. 26 : Régulation intermoléculaire des sous-unités de la PI3K et schéma de la signalisation induite en aval de PI3K par l'activation de MET

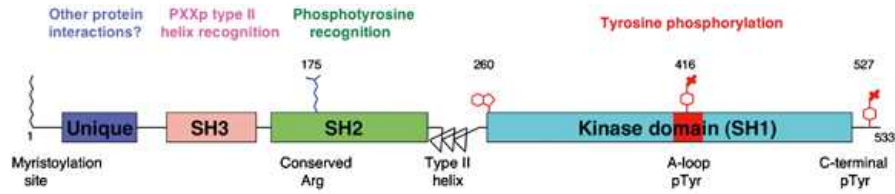
iv PI3K

La PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase), est une enzyme comprenant 2 sous-unités : une unité catalytique de 110 kDa (p110), et une unité régulatrice de 85 kDa (p85) (Vanhaesebroeck et al., 2005) (Fig. 26 haut). La PI3K produit du phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate [(PtdIns(3,4,5)P3) ou PIP3], un second messager lipidique, qui contrôle un grand nombre de réponses cellulaires via l'activation de voies de signalisation. La signalisation via le PIP3 est inhibée par des lipides phosphatases, tels que PTEN ou SHIP, qui le transforme en phosphatidylinositol (4,5) biphosphate [(PtdIns(4,5)P2) ou PI4,5P2] ou en PtdIns(3,4)P2 (PI3,4P2), respectivement. Deux différents domaines peuvent reconnaître le PIP3, le domaine FYVE et le domaine homologue à la pleckstrine (PH). Beaucoup de protéines possèdent ce domaine PH, tel que PDK1 (3' phosphoinositide-dependent kinase 1) ou Akt/PKB. La phosphorylation de PIP3 par la PI3K va être reconnue par le domaine PH de AKT qui est transloqué à la membrane, ce qui permet une hétérodimérisation avec PDK1, qui va l'activer par phosphorylation des résidus thréonine 308 et sérine 473. Le domaine serine/thréonine kinase de AKT actif va permettre de phosphoryler de nombreuses cibles et de médier ses effets biologiques, tels que la protection de l'apoptose ou la prolifération (Fresno Vara et al., 2004).

L'activation de MET permet le recrutement direct de p85 PI3K par le domaine multisubstrat (Y14 et Y15) (Ponzetto et al., 1993), mais également il peut recruter indirectement p85, via la phosphorylation de Gab1 (Bardelli et al., 1997; Weidner et al., 1996) ou éventuellement par CBL (Tsygankov et al., 2001). L'activation de PI3K va permettre de phosphoryler les PIP3, permettant le ciblage membranaire de nombreuses protéines, comme Gab1, AKT ou PDK1. L'activation de PI3K par MET est importante pour son activité de survie, de dispersion ou de morphogénèse (Maroun et al., 1999a; Maulik et al., 2002) (Fig. 26 bas).

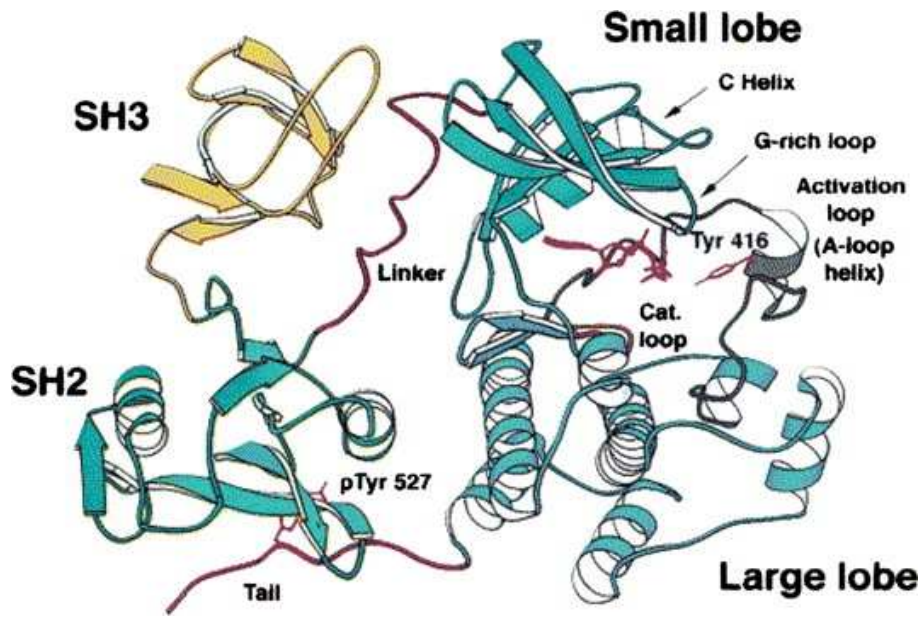
v Src

Le non-récepteur tyrosine kinase Src a historiquement été identifié comme le premier oncogène, isolé à partir du sarcome de Rous (Stehelin et al., 1976). La région N-terminale de tous les membres de la famille Src est myristoylée, ce qui permet de les ancrer à la membrane plasmique (Fig. 27a) (Boggon and Eck, 2004). Ensuite se trouve une séquence de 50 à 80



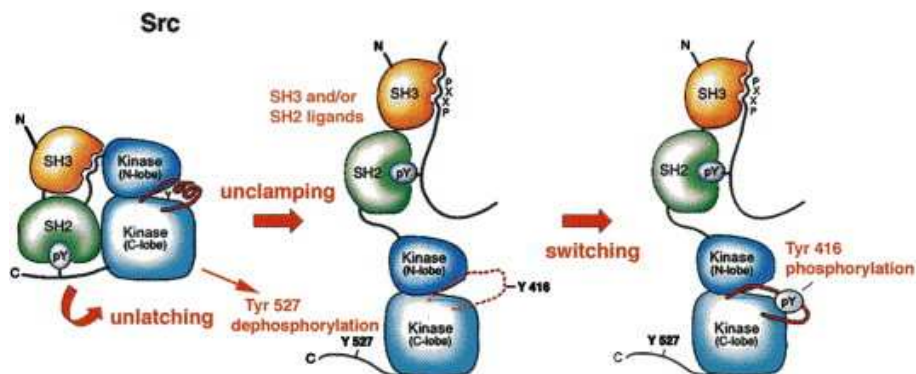
(d'après Boggon TJ et Eck MJ, 2004)

(A) Les domaines de Src



(d'après Xu W & al., 1999)

(B) Structure en rubans de la forme inhibée de Src



(d'après Harrison C, 2003)

(C) Activation de Src par ouverture du loquet (unlatching), desserrage de l'étau (unclamping), et ouverture de l'interrupteur (switching).

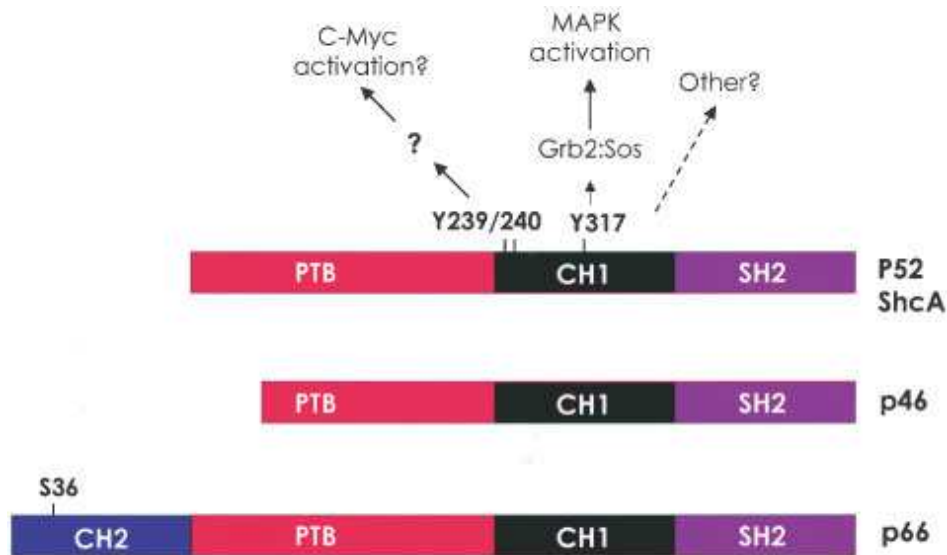
Fig. 27: Les domaines, la structure et la régulation intramolécule de Src.

acides aminés, qui est très variable selon les membres de la famille, et est baptisée domaine « unique ». Les protéines de la famille Src possèdent également un domaine SH3 et un domaine SH2 (Src homology 3 et 2), qui contribuent à la régulation de l'activité de la kinase, par des interactions intramoléculaires (Fig. 27c) (Harrison, 2003). De plus, les interactions entre les domaines SH2 et SH3 avec d'autres molécules de signalisation apportent des contrôles supplémentaires à l'activité de Src. Au niveau de l'extrémité C-terminale de Src est localisée une tyrosine hautement conservée, Y527, dont la phosphorylation inhibe totalement l'activité kinase en interagissant avec le domaine SH2, et maintenant la molécule dans une conformation fermée (Fig. 27b et c) (Xu et al., 1999).

Src, via son domaine SH2, se lie à de nombreux partenaires phosphorylés sur des tyrosines. Il interagit notamment directement sur les tyrosines Y14 ou Y15 de MET (Ponzetto et al., 1994), et pourrait également être activé par SHP2, capable de spécifiquement déphosphoryler la Y527 (Roskoski, 2005), mais cela n'a pas été montré directement dans la signalisation de MET. Les substrats de Src sont nombreux, parmi lesquels p85 de PI3K, FAK, RasGAP, Shc et de nombreuses protéines de signalisation de l'intégrine (tensine, vinculine, cortactine, taline et paxilline), et ses effets biologiques sont majoritairement la dispersion et la motilité. Peu de travaux ont lié l'activation de Src aux effets biologiques de MET, on peut quand même citer que l'utilisation d'un dominant négatif de Src diminue la tumorigénicité induite par un mutant activé de MET (M1268T) (Nakaigawa et al., 2000) et que l'activité de Src est nécessaire à la croissance sans ancrage induite par l'HGF/SF (Rahimi et al., 1998).

vi Shc

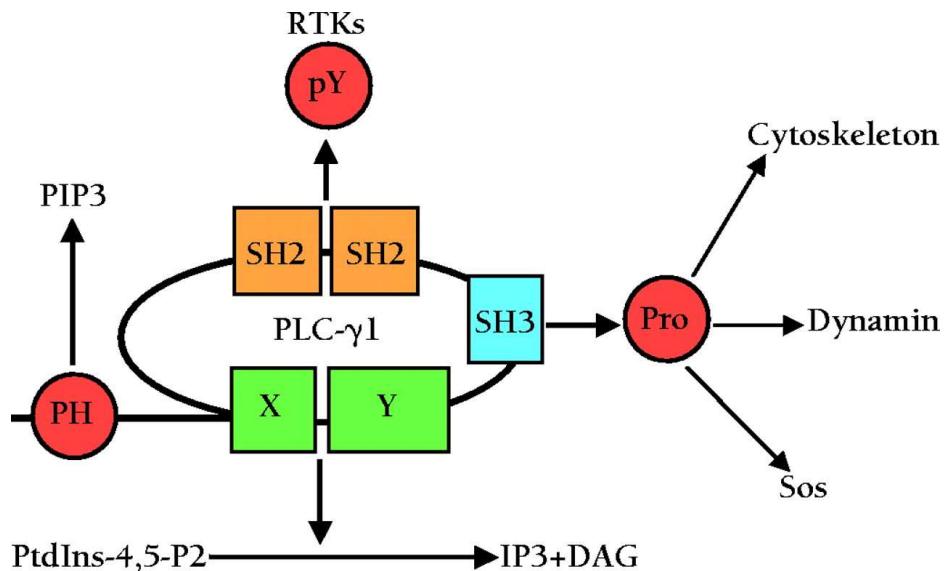
Shc est une protéine adaptatrice qui contient un domaine PTB (Phosphotyrosine binding) et un domaine SH2, séparé par un domaine central (CH : collagen homology), où sont localisés la plupart des sites de phosphorylation sur des tyrosines. Les domaines PTB et SH2, dont les structures sont très différentes entre elles, reconnaissent toutes les deux des tyrosines phosphorylées. La conséquence est que les domaines PTB et SH2 ne reconnaissent pas les mêmes sites, selon l'environnement de la tyrosine phosphorylée : le domaine PTB reconnaît une séquence en amont de la phosphotyrosine (de type N-P-X-pY), alors que le domaine SH2 reconnaît la séquence en aval de la phosphotyrosine (par exemple pY-V-N-V pour le domaine SH2 de Grb2). De plus, il existe une forte homologie de structure entre le domaine PTB et le domaine PH, qui lui permet d'interagir également avec le PI4,5P2 (Zhou et



Les domaines PTB et SH2 interagissent avec des tyrosines phosphorylées, et trois sites de phosphorylation sur des résidus tyrosine ont été identifiés dans le domaine CH (Collagen homology).

Fig. 28: Organisation schématique des isoformes de ShcA

(d'après Ravichandran KS, 2001)



X et Y sont les domaines catalytiques de la PLCγ1; Pro : domaine riche en proline; pY : phosphotyrosine; PH : pleckstrin homology; PIP3 : PtdIns(3,4,5)P3; IP3 : Inositol Tri phosphate; DAG : Diacylglycerol

Fig. 29: Organisation des domaines de PLCγ1, et leurs interactions avec des protéines ou des lipides.

(d'après Wang Z et Moran MF, 2002)

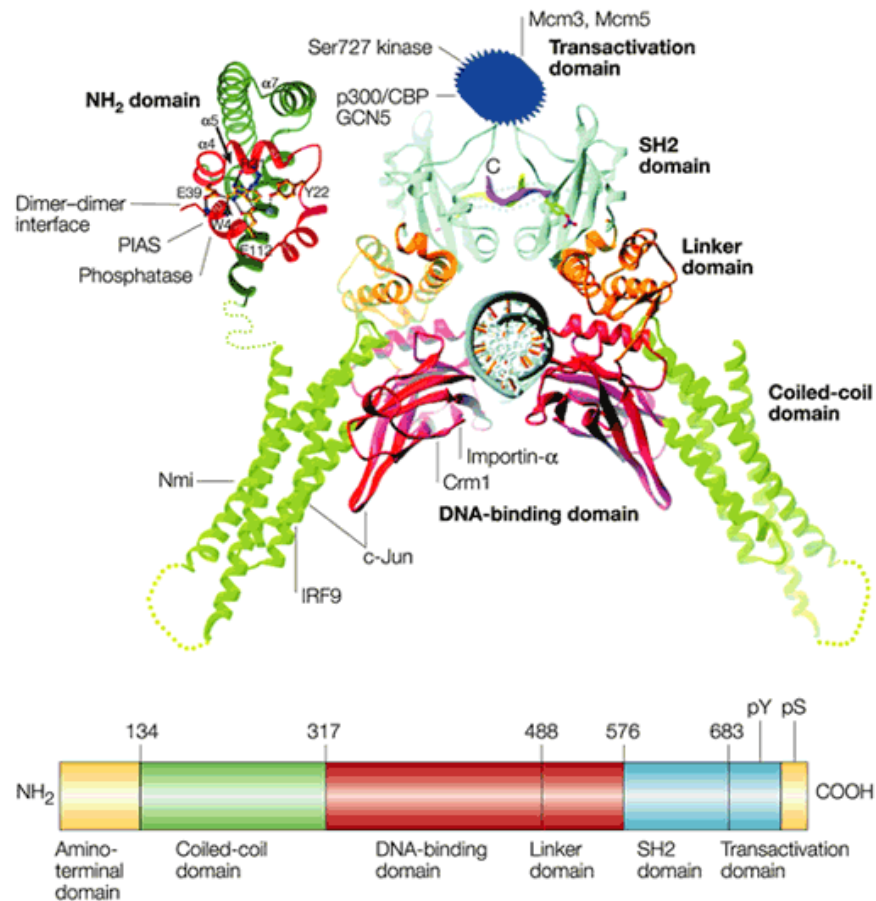
al., 1995) et le PIP3 (Rameh et al., 1997) et de localiser Shc à la membrane. Il existe trois homologues de Shc chez les mammifères (Fig. 28) (Ravichandran, 2001), un chez la drosophile et un chez *C. elegans*. ShcA est exprimé de manière ubiquitaire, alors que ShcB et ShcC semblent restreints aux cellules neuronales. ShcA est exprimé sous 3 isoformes de 46, 52 et 66 kDa, issues du même gène, et résultat de splicing alternatif.

Le récepteur MET peut interagir avec Shc par l'intermédiaire des tyrosines Y14 et Y15 phosphorylées, et induit sa phosphorylation (Pelicci et al., 1995). Shc agit alors comme un adaptateur et peut recruter le complexe Grb2/Sos, mais pourrait également recruter d'autres protéines, telles que Gab1 ou Gab2 (Gu et al., 2000; Ong et al., 2001). L'activation de Shc est impliquée dans l'activation de la voie Ras, qui permet entre autre la dispersion des cellules. Il a été montré que des mutants de Shc, mais pas de Grb2, sont moins transformants, notamment en induisant moins d'angiogénèse (Saucier et al., 2004), et que le recrutement de Shc par TPR-MET est nécessaire à son activité transformante (Saucier et al., 2002).

vii *PLCγ*

Une grande variété de récepteurs tyrosine kinase phosphoryle et active la phospholipase Cγ1 (PLCγ1), y compris MET. La protéine contient deux domaines SH2, un domaine SH3, un domaine PH et deux domaines catalytiques. Via ses domaines SH2, la PLCγ1 est recrutée par les récepteurs tyrosine kinases, qui la phosphorylent, ce qui augmente son potentiel catalytique. Le domaine SH3 permet d'interagir avec des régions riches en proline, le domaine PH permet de localiser la protéine à la membrane via des interactions avec le PIP3. L'activité catalytique permet de synthétiser du diacylglycerol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP3), à partir de PIP4,5P2. La production de DAG permet l'activation de la plupart des isoformes de protéines kinases C (PKC) alors que l'IP3 induit la mobilisation du calcium intracellulaire (Fig. 29) (Wang and Moran, 2002).

La PLCγ1 est recrutée par le récepteur MET sur les tyrosines Y14 et Y15, ce qui induit sa phosphorylation (Okano et al., 1993; Ponzetto et al., 1994), mais peut aussi être recruté indirectement via la phosphorylation de Gab1 (Gual et al., 2000). Il a été montré que des mutations de Gab1 empêchant son interaction avec la PLCγ1 empêche la morphogénèse induite par l'HGF/SF (Gual et al., 2000), ce qui suggère que la PLCγ1 se lie



La structure centrale correspond à la fixation d'un dimère de STAT1 à l'ADN et l'association de nombreuses protéines aux différents domaines. La structure de la région amino-terminale, dont la localisation précise n'est pas définie par rapport à la structure centrale, peut aussi interagir avec de nombreuses protéines, de même que l'extrémité C-terminale, composé du domaine de transactivation, dont la structure n'est pas connue. (CBP : BREB binding protein; IRF : Interferon regulatory factor; Mcm : Mini-chromosome maintenance; Nmi : N-Myc interactor; PIAS : protein inhibitor of activated STAT).

Fig. 30 : Structure d'un homodimère de STAT et organisation de ses domaines.

(d'après Levy DE et Darnell JE, 2002)

préférentiellement à Gab1 plutôt qu'à MET, et que son activation est nécessaire à la morphogénèse.

viii STAT3

STAT3 appartient à la famille des STAT pour « Signal transducer and activator of transcription », qui sont surtout décrits pour médier la signalisation des récepteurs aux interférons. La protéine, activée par phosphorylation dans le cytoplasme, va se dimériser pour migrer dans le noyau, où elle agit comme un facteur de transcription en se liant à ses séquences-cibles d'ADN. STAT3 est composé d'un domaine de fixation à l'ADN central, un domaine de transactivation localisé à l'extrémité C-terminale, un domaine SH2 nécessaire à la dimérisation en interagissant avec la tyrosine phosphorylée de son partenaire, et un domaine coiled-coil, qui permet des contacts avec d'autres facteurs de transcription ou des protéines de régulation (Fig. 30) (Levy and Darnell, 2002). STAT3 est activé par la phosphorylation de la Y705, proche de l'extrémité C-terminale, et également sur la sérine S727, localisé dans le domaine de transactivation. La phosphorylation de la tyrosine est responsable de la dimérisation, via l'interaction avec le domaine SH2 du partenaire, de la translocation dans le noyau, et de la fixation à l'ADN (Levy and Lee, 2002). La phosphorylation sur la sérine S727 est induite par ERK1/2, p38 ou JNK, et semble important pour son activité transcriptionnelle.

Il a été montré que l'HGF/SF induit le recrutement de STAT3 par le récepteur MET au niveau de la tyrosine Y15, la phosphorylation de STAT3, sa translocation dans le noyau, ainsi que sa fixation à l'ADN (Boccaccio et al., 1998). L'activation de STAT3 par MET semble nécessaire à la morphogénèse, à la croissance sans ancrage, ainsi qu'à la tumorigénèse (Cramer et al., 2005; Zhang et al., 2002). De plus, des travaux ont montré qu'une mutation activatrice dans MET, au niveau de la boucle P+1 (M1268T), induit la phosphorylation constitutive de STAT3 par MET, ce qui pourrait être important dans le potentiel métastatique de cette mutation (Klosek et al., 2004; Yuan et al., 2004).

ix FAK

FAK (Focal adhesion kinase) est une tyrosine kinase non récepteur de 125 kDa localisé dans les complexes d'adhérence. Elle est connue pour son rôle pivot dans le contrôle

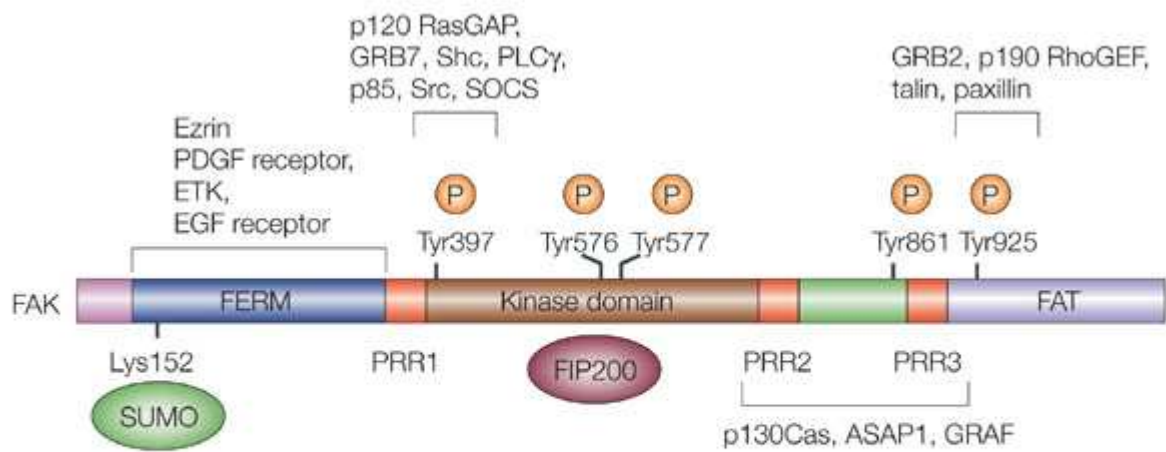


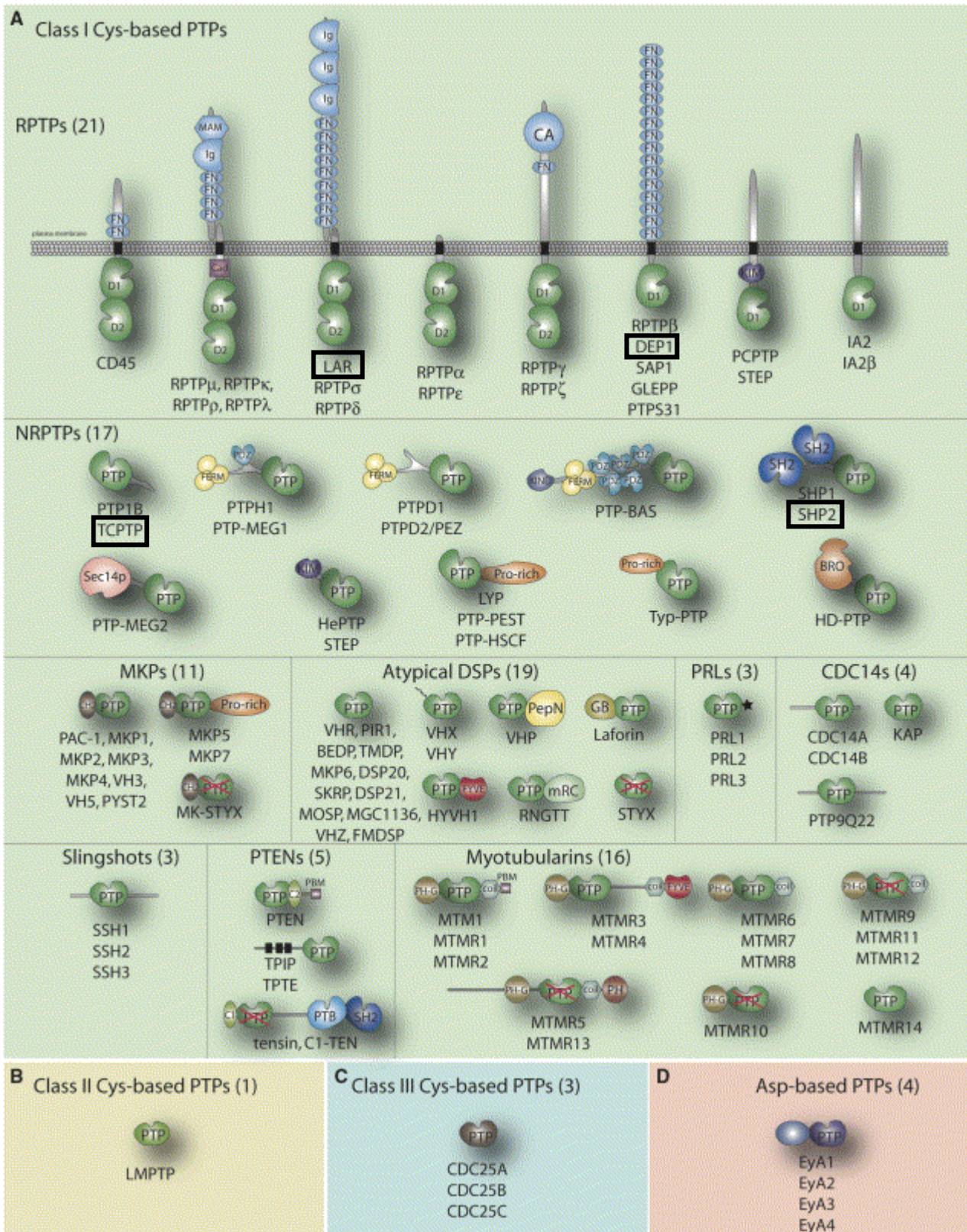
Fig. 31: Les domaines de FAK

(d'après Mitra SL & al., 2005)

des fonctions cellulaires médiées par les intégrines (Mitra et al., 2005; Parsons, 2003). Il devient rapidement phosphorylé sur des tyrosines et activé suite à l'adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire. De plus, FAK pourrait être un point de convergence entre les voies de signalisation des intégrines et des récepteurs à facteurs de croissance. De nombreux facteurs de croissance ont été montrés pour induire la phosphorylation de FAK, même si la voie d'activation n'est pas toujours très claire.

FAK contient un domaine tyrosine kinase central flanqué de deux larges régions N- et C-terminale (Fig. 31). Sa région C-terminale contient le domaine de ciblage de la protéine au complexe d'adhésion (FAT : Focal adhesion targeting) (Hildebrand et al., 1993), alors que la région N-terminale possède une homologie de séquence avec les protéines du groupe bande 4.1 et ERM (Ezrin, Radixine et Moésine), et est baptisée FERM. Ce domaine permet des interactions protéine-protéine et/ou des interactions protéine-phosphoinositide, et permet en particulier l'interaction de FAK avec la région cytoplasmique des intégrines, le domaine FERM de l'ezrin, le récepteur au PDGF et à l'EGF. Il a également été proposé qu'une interaction intramoléculaire entre le domaine FERM et le domaine kinase inhibe l'activité catalytique de FAK (Cooper et al., 2003). FAK possède également des régions riches en prolines (PRR : Proline rich region). Il est activé par la phosphorylation du résidu tyrosine Y397, qui permet le recrutement de protéines de la famille Src qui vont à leur tour être activées, et vont phosphoryler des résidus du domaine catalytique de FAK : Y407, Y576 et Y577 et de la région C-terminale Y861 et Y925. L'activation de FAK va induire diverses voies de signalisation menant notamment à la PI3K, à Grb2 ou à p130CAS (Cornillon et al., 2003), aboutissant à la transmission de signaux régulateurs pour la migration, la survie et la prolifération cellulaire.

Il a été montré que FAK est impliqué dans la migration induite par l'HGF/SF, et que sa surexpression rendait les cellules sensibles à la transformation par l'HGF/SF (Chan et al., 2002; Lai et al., 2000). FAK et MET semble pouvoir interagir directement via les tyrosines phosphorylées Y14 et Y15 de MET, et le domaine FERM de FAK (Chen and Chen, 2006). Cette interaction directe semble nécessaire pour promouvoir l'invasion induite par l'HGF/SF.



Pour l'explication des noms de domaines, voir la référence ci-après. Sont encadrés les protéines tyrosine phosphatases montré comme ayant un rôle dans la signalisation de MET.

Fig. 32: Structure des domaines de toutes les protéines tyrosine phosphatase (d'après Alonso A. et al., 2004)

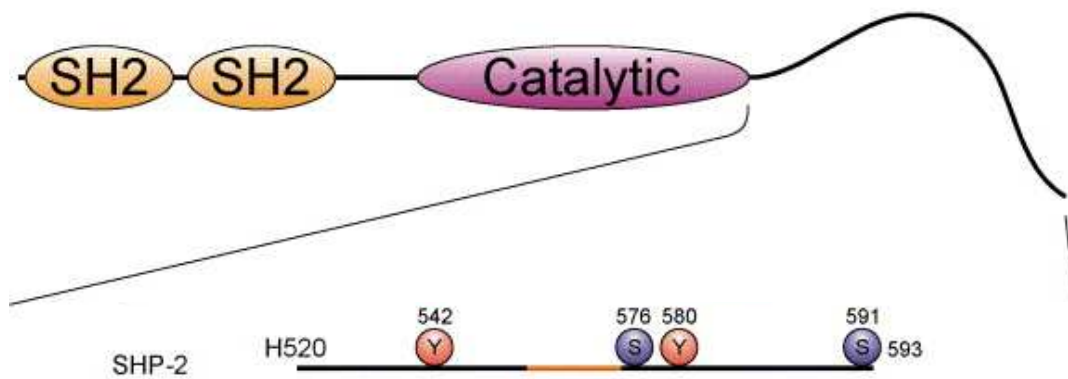
*x Les protéines tyrosine phosphatase : TC-PTP,
LAR, DEP-1 et SHP2.*

Diverses protéines tyrosine phosphatases sont impliquées dans la signalisation de MET, par des interactions directes ou indirectes, ou pour des raisons fonctionnelles, comme sa capacité à déphosphoryler le récepteur MET, sans forcément d'interagir ensemble.

Il existe une centaine de protéines tyrosine kinase dans le génome humain (Robinson et al., 2000), et à peu près autant de protéines tyrosine phosphatases (Fig. 32) (Alonso et al., 2004). De plus, elles existent sous forme membranaire ou libre dans le cytoplasme, comme les tyrosine kinases. La phosphorylation et la déphosphorylation sont les mécanismes opposés d'un même type de modification post-traductionnelle, il paraît évident que parler de signalisation par phosphorylation nécessite de prendre en compte leurs mécanismes de régulation, et donc particulièrement leur déphosphorylation. Certains travaux ont mené à la découverte d'interactions entre protéines tyrosine phosphatases et MET : deux de manière directe : la TC-PTP et LAR, et une de manière indirecte : SHP2

Initialement, une activité tyrosine phosphatase avait été montrée associée à la région juxtamembranaire de MET (Villa-Moruzzi et al., 1993) la protéine portant cette activité fut identifiée plus tard comme la **PTP-S** (Villa-Moruzzi et al., 1998). Depuis, cette protéine tyrosine phosphatase a changé de nom, et est devenu la **TC-PTP** (T-cell protein tyrosine phosphatase) de part sa découverte dans les lymphocytes T (Alonso et al., 2004). La TC-PTP est homologue à la PTP1B, qui sont des tyrosine phosphatases de type non-récepteur, de 48,5 et 50 kDa respectivement (Bourdeau et al., 2005). La TC-PTP est exprimée de manière ubiquitaire et est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation, en particulier dans les voies JAK/STAT, mais également pour la signalisation de l'EGFR ou du PDGFR. Aucune suite n'a été publiée concernant un rôle potentiel de TC-PTP dans la signalisation de MET. On peut néanmoins se demander si la présence de cette tyrosine phosphatase ne pourrait pas en partie expliquer la fonction inhibitrice de la région juxtamembranaire du récepteur. La PTP1B a été montrée capable de déphosphoryler le domaine kinase de MET dans des bactéries, ce qui a permis de réaliser la structure cristallographique d'une forme entièrement déphosphorylée de la kinase (Wang et al., 2006), alors qu'aucune évidence n'a été montrée pour l'activité de la PTP1B sur le récepteur MET dans des cellules.

Un récepteur tyrosine phosphatase est capable de déphosphoryler MET, il s'agit du récepteur **LAR** (Leukocyte common antigen-related) (Machide et al., 2006). LAR est



Structure des domaines de SHP2 avec zoom sur la région C-terminale contenant des résidus phosphorylables (rouge : tyrosine; bleu : sérine) et une séquence riche en proline (orange) qui pourrait permettre le recrutement de domaines SH3 ou WW.

Fig. 33: Structure des domaines de SHP2, avec détail de la région C-terminale

(d'après Poole AW et Jones ML, 2005)

constitué d'une région extracellulaire comprenant trois domaines ressemblant à des immunoglobulines et 8 structures de fibronectine de type III, et d'une région cytoplasmique contenant deux domaines tyrosine phosphatase. LAR participe à la suppression de phosphorylation sur des tyrosines en réponse aux changements de l'adhésion cellulaire et aux contacts cellulaires. Il a été montré que l'association de LAR avec MET est régulé par les contacts cellule-cellule, et que LAR joue un rôle dans l'inhibition de contact de la réponse induite par MET, par la déphosphorylation du récepteur réalisée dans les hépatocytes à confluence.

MET et GAB1 sont déphosphorylables *in vitro* par la région intracellulaire du récepteur tyrosine phosphatase **DEP-1** (Palka et al., 2003), qui est exprimé quand les cellules approchent la confluence. DEP-1 déphosphoryle spécifiquement les résidus Y14 et Y16, il est donc un régulateur potentiel de signalisation. Néanmoins, ni interaction, ni évidence biologique n'a été montrée qui permettrait d'affirmer d'un rôle pour DEP-1 dans la signalisation de MET, même si l'activation de DEP-1 par dimérisation supprime la phosphorylation de MET et de ERK dans des cellules endothéliales (Takahashi et al., 2006).

SHP2 est une protéine tyrosine phosphatase cytosolique qui contient des domaines SH2 et qui peut être recrutée par Gab1 activé, mais non pas directement par MET (Cunnick et al., 2001). De plus, SHP2 est phosphorylable et possède une séquence riche en prolines (Fig. 33) (Poole and Jones, 2005). Des mutants de Gab1 déficients pour l'interaction avec SHP2 perdent les capacités morphogènes de MET (Maroun et al., 2000; Sachs et al., 2000; Schaeper et al., 2000). L'interaction avec Gab1 permet l'activation conformationnelle de SHP2, et l'interaction avec ses substrats, tels que Gab1 lui-même (Barford and Neel, 1998). Il est intéressant de noter que SHP2 a été montré comme étant capable d'induire la voie Ras et la voie PI3K (Wu et al., 2001). SHP2 n'a pas d'activités inhibitrices de la signalisation de MET, telles que son potentiel tyrosine phosphatase laissait présager. La présence de SHP2 n'est pas nécessaire à l'activation de ces voies en aval de récepteurs, mais SHP2 permet leur activation soutenue (Cunnick et al., 2002; Maroun et al., 2000), vraisemblablement par l'inhibition d'inhibiteur de la voie Ras, tel que RasGAP (Montagner et al., 2005). SHP2 peut également activer Src par la déphosphorylation du site de recrutement de son inhibiteur Csk (C-terminal Src kinase), conduisant à une activation de RasGAP par Src (Zhang et al., 2004). Néanmoins, d'autres substrats de SHP2 restent à découvrir, notamment ceux menant à l'activation de PI3K. La voie GAB1-SHP2 a été montrée comme essentielle dans plusieurs effets biologiques de MET, tels que la morphogenèse ou la régénération du foie (Bard-Chapeau et al., 2006). Enfin, SHP2 est également considéré comme un oncogène, car une mutation dominante

autosomale et héréditaire est la cause de 50% des syndromes de Noonan (Tartaglia et al., 2001), et des mutations sporadiques ont été montrées dans différents cancers (Ostman et al., 2006).

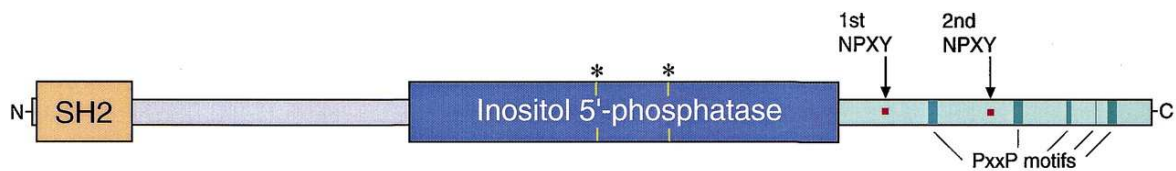
En conclusion, les protéines tyrosine phosphatases sont peu décrites pour inhiber la signalisation de MET. Outre SHP2 dont le rôle est connu, mais dont l'activation induit une signalisation « positive », la régulation « négative » par des tyrosine phosphatases reste peu décrite. Pourtant, l'inhibition de l'activité phosphatase dans les cellules induit une forte augmentation de la phosphorylation de MET (voir Article III), et donc MET semble régulé négativement par des tyrosine phosphatases. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour pouvoir inclure clairement des protéines tyrosine phosphatases à la régulation de la signalisation du couple HGF/SF-MET.

xi Les autres partenaires directs de MET : RanBPM, Bag-1, SHIP-1, FAP68, DAPK3, ...

RanBPM/RanBP9 et **RanBP10** (Ran Binding protein) sont capables de s'associer avec le domaine tyrosine kinase de MET (Wang et al., 2002a; Wang et al., 2004; Zou et al., 2003). L'activation de MET par l'HGF/SF favorise cette interaction qui permet le recrutement de Sos par RanBPM, mais pas par RanBP10, et l'activation de la voie Ras. RanBPM est capable de s'associer à Ran, petite GTPase importante pour le transport nucléaire, le fuseau mitotique et l'assemblage de l'enveloppe nucléaire, et a été montré pour interagir avec de nombreuses molécules de signalisation, notamment des intégrines (Denti et al., 2004), des plexines (Togashi et al., 2006) ou d'autres récepteurs tyrosine kinase (Hafizi et al., 2005).

Bag-1 a été isolée suite à l'hybridation d'une protéine recombinante de la région intracellulaire de MET sur une banque d'expression issue d'un embryon de souris (Bardelli et al., 1996). Il s'agit d'une protéine pro-apoptique, notamment grâce à son interaction avec Bcl-2. Les sites nécessaires à l'interaction ne sont pas connus, et semble être indépendant de la phosphorylation de MET. Le peu de suite qu'a donné ce travail princeps, voire même la démonstration de la non association de MET et de Bag-1 dans un contexte donné (Nakagami et al., 2004) rend très suspect cette association, et très hypothétique son rôle dans la signalisation de MET.

SHIP-1 (SH2-containing inositol 5-phosphatase) et **SHIP-2** sont des protéines qui contiennent un domaine SH2 qui leur permet d'interagir avec d'autres protéines, et un



Les domaines de la protéine SHIP-1. Elle possède un domaine SH2 amino-terminal et un domaine portant l'activité catalytique inositol 5'-phosphatase dans la région centrale. Les deux astérisques au-dessus du domaine enzymatique marquent la localisation de régions homologues avec toutes les 5' phosphatases. Les deux motifs NPXY, quand phosphorylées sur des tyrosines, peuvent lier des domaines PTB. La région C-terminale contient des motifs riches en proline potentiels PxxP, qui peuvent lier des domaines SH3.

Fig. 34: Structure des domaines de SHIP-1

(d'après Rohrschneider LR et al., 2000)

domaine enzymatique (inositol 5' phosphatase) qui permet de retirer le phosphate en position 5' de l'inositol polyphosphate, mais requiert la phosphorylation en 3' pour fonctionner (Fig. 34). (N.B. : Attention de ne pas confondre SHIP-1 et 2 qui sont des Inositols phosphatases, avec SHP2 qui est une tyrosine phosphatase. Elles n'ont rien en commun si ce n'est leur homonymie.) Elles contiennent également des sites de phosphorylation, permettant l'interaction avec des domaines PTB (Phospho tyrosine binding), tel que Shc, et plusieurs sites riches en proline qui pourrait interagir avec des domaines SH3. Le patron d'expression de SHIP-1 est restreint aux cellules hématopoïétiques et aux spermatozoïdes, alors que SHIP-2 est exprimé de manière plus ubiquitaire (cellules sanguines, muscles squelettiques, cœur, placenta et pancréas).

SHIP-1 et SHIP-2 ont été montrés pour être des partenaires de MET en interagissant l'un et l'autre avec la Y15 phosphorylée (Koch et al., 2005; Stefan et al., 2001), tout comme Grb2. Ils peuvent également interagir avec Grb2 et Shc dans d'autres systèmes. Il a été montré que la surexpression de SHIP-1 augmente la morphogénèse induite par MET (Stefan et al., 2001), mais les deux protéines sont également importantes pour la dispersion (Koch et al., 2005; Mancini et al., 2002). Ils pourraient également avoir un rôle dans l'activité de STAT, car elles peuvent interagir avec un inhibiteur de STAT, PIAS1 (Rohrschneider et al., 2000).

FAP68 (FKBP (FK-506 binding protein) associated protein) est appelé aussi glomuline et une mutation héréditaire dominante autosomale est responsable de la GVM (Glomuvenous malformation), aussi appelé glomangiomes, un type de malformation veineuse (Brouillard et al., 2002). Cette protéine est vraisemblablement responsable de la mise en place et de la maintenance de vaisseaux sanguins (McIntyre et al., 2004). Une forme inactive de MET a été montrée pour interagir avec la forme de pleine longueur de la glomuline, et perd cette interaction une fois activé (Grisendi et al., 2001), ce qui selon les auteurs empêcherait l'activation de p70S6K lorsque MET est inactif. Il est à ce jour impossible de déterminer le rôle de cette interaction dans la signalisation de MET

D'autres partenaires ont été découverts en réalisant un double-hybride avec comme appât l'oncogène TPR-MET (Schaaf et al., 2005), identifiant 8 nouveaux partenaires, parmi lesquels : DAPK3, SMC-1, CENPC et mTID-1. Certains n'interagissent qu'avec une forme non phosphorylée de TPR-MET : DAPK3, SNAPIN et SMC-1, d'autres avec les 2 formes. Des études complémentaires devront être menées pour vérifier l'interaction dans des modèles cellulaires, et pour comprendre le rôle de ces protéines dans la signalisation de MET.

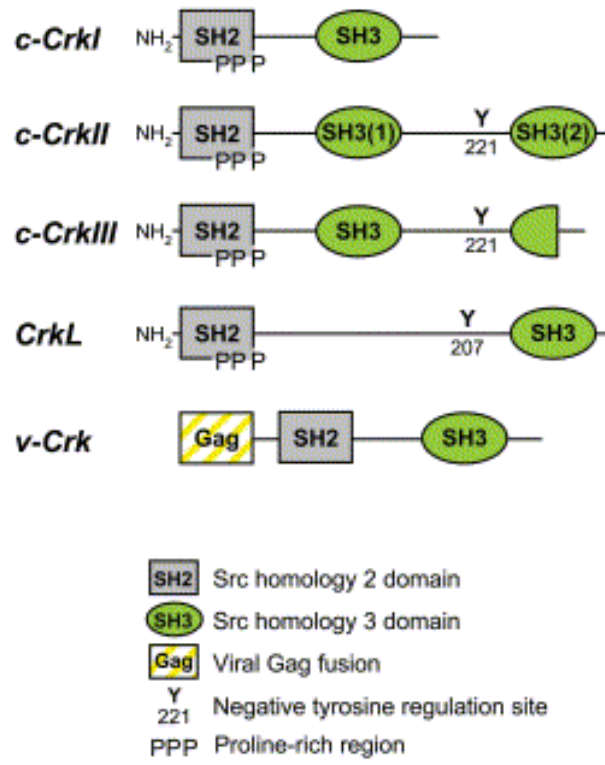
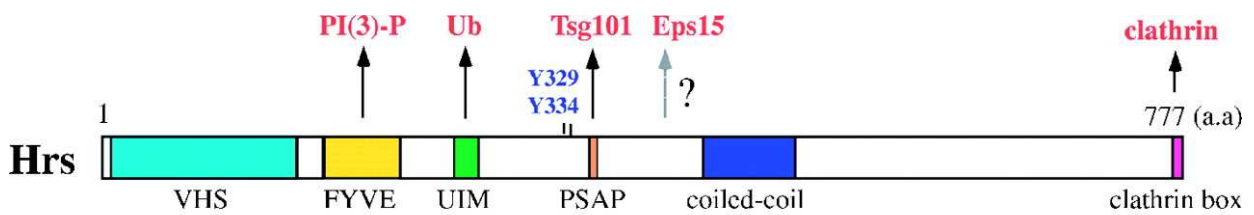


Fig. 35: Structure des domaines de la famille Crk
(d'après Chodniewicz D et Klemke RL, 2004)



Les sites de phosphorylation sont indiqués en bleu, Hrs lie la protéine STAM via son domaine coiled-coil. Le domaine de liaison à Eps15 n'a pas été localisé précisément. VHS : Vps27/Hrs/STAM domain; FYVE : Fab1/YOTB/Vac1/EEA1 domain; UIM : Ubiquitin interaction motif; PSAP : Tétrapeptide qui permet la liaison avec Tsg101.

Fig. 36: Structure des domaines de Hrs

(d'après Komada M et Kitamura N, 2005)

xii Les partenaires indirects majeurs de MET pour sa signalisation

(a) CRK

Les protéines de la famille des adaptateurs Crk contiennent des domaines SH2 et SH3 : CrkII contient 1 domaine SH2 et 2 domaines SH3 alors que son homologue CrkI ne contient qu'un seul domaine SH3. Les autres membres de la famille sont CrkIII et CrkL, qui sont très proches entre eux (Fig. 35). Le domaine SH2 de Crk reconnaît spécifiquement les sites pY-X-X-Pro, alors que les domaines SH3 permettent l'interaction avec des régions riches en proline avec une séquence consensus Pro-X-X-Pro-X-Lys, qui permet de lier ses effecteurs (Chodniewicz and Klemke, 2004). Crk a été montré pour interagir avec GAB1 via son domaine SH2 et permettre de le lier aux GTPase Rac1 pour activer la mobilité cellulaire (Kiyokawa et al., 1998; Watanabe et al., 2006) et Rap1 pour l'adhésion cellulaire (Sakkab et al., 2000). De plus, Crk permet l'activation de JNK par MET, vraisemblablement par Rac1 (Garcia-Guzman et al., 1999), qui est activé puis réprimé dans la signalisation de l'HGF/SF (Paumelle et al., 2000). Crk peut interagir avec de nombreux partenaires et pourrait servir d'adaptateur supplémentaire dans la signalisation de MET, en recrutant des protéines de signalisation et activant des voies.

(b) Hrs

Hrs (hepatocyte growth factor-regulated substrate) a d'abord été identifié comme un substrat majeur de phosphorylation sur des tyrosines en réponse à un traitement par l'HGF/SF (Komada and Kitamura, 1995). Il a ensuite été montré pour intervenir dans le mécanisme de dégradation de divers récepteurs tyrosine kinase, tels que MET, via le recrutement par des ubiquitines (Abella et al., 2005). Hrs est une protéine endosomale qui permet le ciblage du récepteur ubiquitynilé vers le lysosome, via un domaine d'interaction avec l'ubiquitine (UIM : Ubiquitine interaction motif) (Fig. 36) (Komada and Kitamura, 2005). Hrs est recruté après l'internalisation du récepteur dans les « clathrin coated pits », et permet au récepteur MET de migrer vers les endosomes pour suivre sa voie de dégradation par les lysosomes. L'interaction de MET avec Hrs est nécessaire puisque le défaut d'ubiquitynylation du récepteur entraîne des activités transformantes, qui sont diminuées en étiquetant le récepteur d'une ubiquitine

Partenaire	Type d'interaction avec MET	Activité biochimique	Activité biologique
Grb2	Direct (Y15) ou indirect (via Gab1 ou Shc)	Adaptateur	Prolifération, transformation et motilité
Gab-1	Direct (Y14) ou indirect (via Grb2)	Adaptateur	Essentiel à la signalisation de MET
CBL	Direct (Y2) et indirect (via Grb2)	Adaptateur et E3 ubiquitin ligase	Internalisation, dégradation et transformation
PI3K	Direct (Y14 ou Y15, Y13?) ou indirect (via Gab1)	Lipide kinase	Survie, motilité et morphogénèse
FAK	Direct (Y14 ou Y15)	Tyrosine kinase	Motilité et transformation
Src	Direct (Y14 ou Y15)	Tyrosine kinase	Prolifération, transformation et motilité
Shc	Direct (Y14 ou Y15)	Adaptateur	Prolifération, motilité et transformation
PLCγ1	Direct (Y14 ou Y15) ou indirect (via Gab1)	Phospholipase	Morphogénèse
STAT3	Direct (Y15 ou Y16?)	Facteur de transcription	Morphogénèse et transformation
SHP2	Indirect (via Gab1)	Tyrosine phosphatase	Morphogénèse
Crk	Indirect (via Gab1)	Adaptateur	Morphogénèse
Hrs	Indirect (via ubiquitine)	Adaptateur	Trafic et transformation

Tableau 8 : Récapitulatif des partenaires principaux de MET et leurs fonctions principales décrites dans les effets biologiques de MET

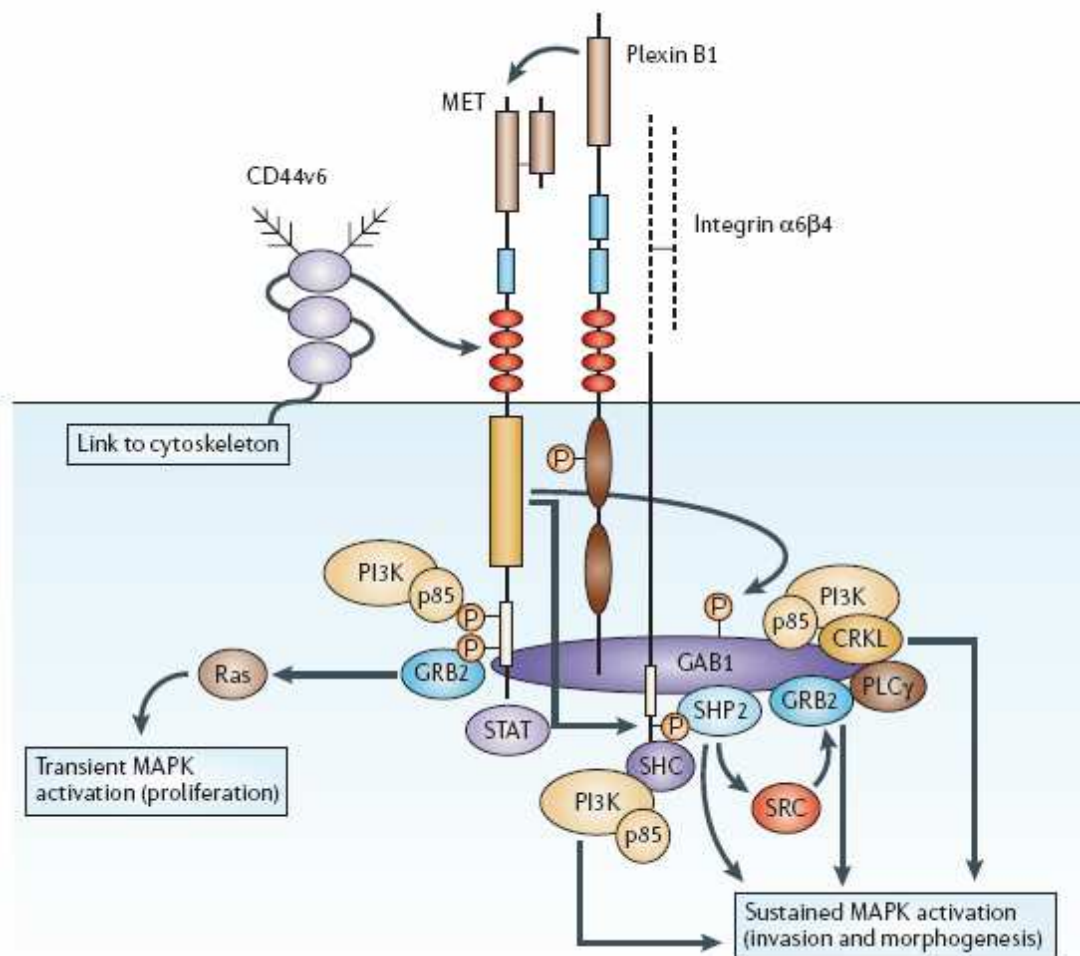


Fig. 37: Le signalosome de MET activé.

(d'après Boccaccio C et Comoglio PM, 2006)

(Abella et al., 2005). Ainsi Hrs est, avec CBL, une protéine-clé pour l'internalisation et la dégradation du récepteur MET activé.

e. Voies de signalisation

i Les voies de signalisation principales engagées par MET

Le récepteur MET permet le recrutement de nombreux partenaires protéiques, qui eux-mêmes recrutent d'autres partenaires... (Tableau 8 et Fig. 37) (Boccaccio and Comoglio, 2006). En l'état actuel des connaissances, il est évident que tous les partenaires ne pourront pas agir en même temps, et la régulation de ces recrutements est difficile à intégrer, et pourtant détermine certainement la réponse induite par l'HGF/SF dans les cellules. De nombreux niveaux de régulation doivent être ajoutés à la liste des partenaires, même proche de l'exhaustivité, pour en comprendre les rouages. Tous ces recrutements permettent l'activation des voies de signalisation qui conduisent à des effets biologiques de MET dans les cellules. Tout d'abord, la voie menant à l'activation de la MAPK ERK régule l'expression des gènes de régulateurs du cycle cellulaire (tels que la protéine du rétinoblastome pRB, cdk6 ou p27) et des protéinases de la matrice extracellulaire (telles que les métalloprotéinases de la matrice (MMP) ou l'urokinase activateur de plasminogène (uPA)), ainsi que des altérations des fonctions du cytosquelette qui contrôle la migration, l'invasion et la prolifération. Les voies menant à l'activation de Pak ou de Rap1 régulent aussi le cytosquelette et des molécules d'adhésion cellulaires telles que les cadhérines, ARP2/3, N-WASP, paxilline, intégrines et FAK. La voie PI3K-AKT contrôle la survie cellulaire notamment par l'inhibition de Bad et de la caspase 9. La réponse biologique la plus complexe induite par MET, la formation de tubules, nécessitent l'activation de l'ensemble de ces voies (Fig. 38) (Boccaccio and Comoglio, 2006).

La protéine Gab1, élément clé de la signalisation de MET, est également activé par phosphorylation en réponse à de nombreux facteurs de croissance et cytokines, tel que l'HGF/SF bien sûr, l'EGF, le NGF, l'insuline, le PDGF, les interleukines IL-3 et IL-6 et les interférons (IFN) α et γ . De plus, il a été démontré que les mêmes sites de phosphorylation de Gab1 sont activés en aval de l'HGF/SF et de l'EGF, suggérant que les mêmes effecteurs sont recrutés (Gual et al., 2000). Mais pour la plupart des cellules et des conditions cellulaires,

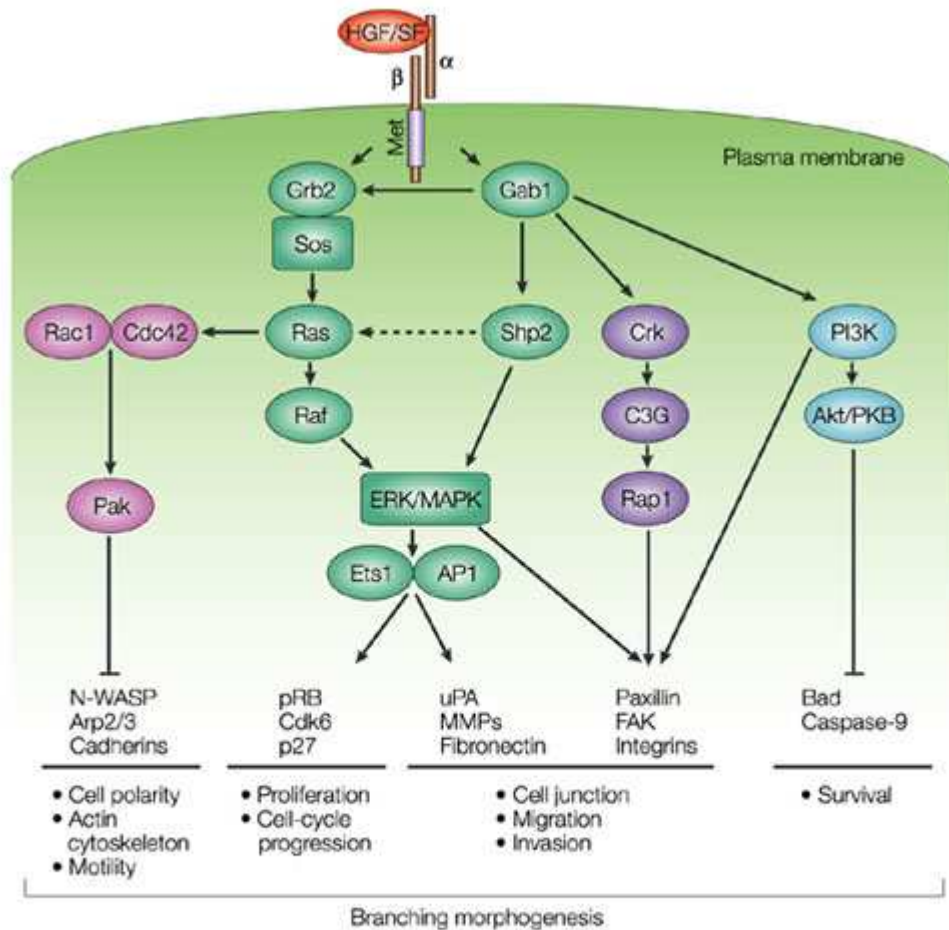


Fig. 38: Les voies de signalisation induites par l'activation de MET

(d'après Boccaccio C et Comoglio PM, 2006)

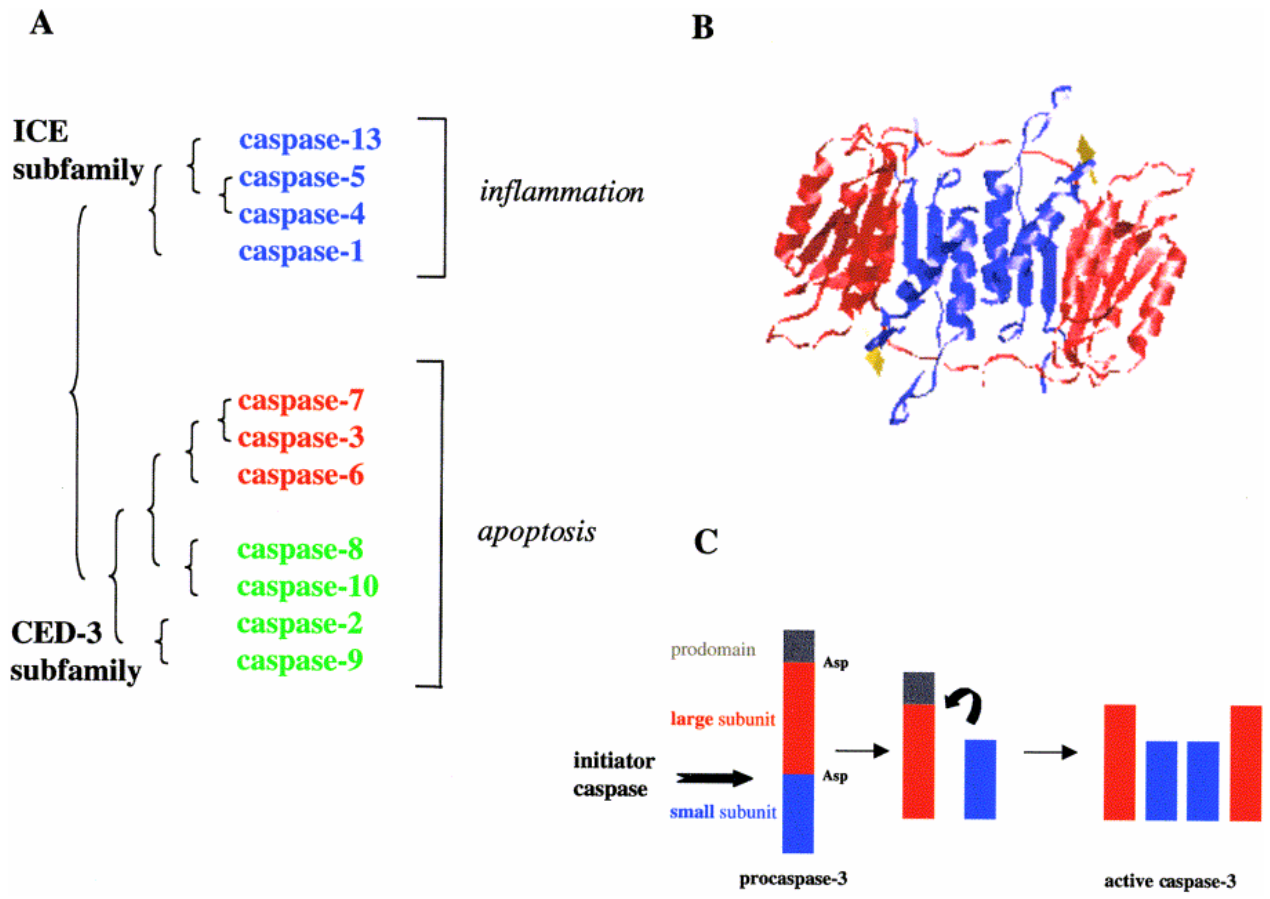
seule l'activation de MET induit la morphogénèse de branchement (Barros et al., 1995; Sachs et al., 1996). Une première explication serait que bien que l'HGF/SF et l'EGF induisent une rapide phosphorylation de Gab1, seule l'activation de MET réalise une phosphorylation persistante. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que Gab1 s'associe directement à MET via un MET binding domain, alors qu'il ne s'associe qu'indirectement, via Grb2, au récepteur à l'EGF. L'interaction pourrait dès lors être plus stable avec le récepteur MET et prolonger l'activation de Gab1. L'activation prolongée de Gab1 est corrélée avec l'activation soutenue de la voie menant à l'activation de la MAPK ERK et de AKT (Gual et al., 2000).

ii *Trafic et dégradation du récepteur MET activé*

Bien que j'ai déjà décrit la voie d'internalisation de MET et sa dégradation par le lysosome dans le paragraphe concernant le recrutement de CBL et dans la figure 22, j'ai souhaité y revenir à la lumière des travaux récents sur l'internalisation de MET induite par l'InlB, permettant l'entrée dans les cellules de *Listeria monocytogenes*.

Une bactérie a deux moyens majeurs pour entrer dans les cellules, soit elles utilisent le processus de phagocytose, soit l'endocytose. La phagocytose est un processus réservé aux macrophages, monocytes et aux neutrophiles, utilisé pour éliminer les pathogènes et les débris cellulaires. L'endocytose est elle commune à tous les types cellulaires, à l'exception des globules rouges, et permet l'internalisation de petites particules.

L'interaction de l'InlB (comme l'HGF/SF), induit l'activation du récepteur MET et le recrutement de nombreux adaptateurs. En particulier, MET recrute la PI3K qui permet des changements dans la composition en lipides des membranes environnantes, qui permettent des modifications de la forme de la membrane, en plus d'intervenir dans les voies de signalisation. De plus, l'activation de MET induit la phosphorylation de la β -caténine, qui induit la dissociation de la E-cadhérine avec le cytosquelette, et ouvre les jonctions adhérentes. Ensuite, le récepteur MET va recruter l'adaptateur E3 ubiquitine ligase CBL, qui à son tour recrute des partenaires permettant la mise en place d'une vésicule riche en clathrine (Veiga and Cossart, 2005), dans laquelle se retrouve la bactérie. C'est une fois internalisée qu'elle va sécréter une toxine bactérienne, la LLO (listeriolysine O), et exploiter l'actine cellulaire pour bouger à l'intérieur du cytoplasme (Bonazzi and Cossart, 2006). A la différence de l'InlB, l'HGF/SF, une fois internalisé dans les vésicules riches en clathrine, va



A: Les caspases se séparent en deux sous-familles (ICE et Ced-3). Selon leurs spécificités protéolytiques, on peut ensuite les diviser en 3 groupes : les caspases inflammatoires (en bleu) qui permettent la maturation des cytokines, alors que les caspases apoptotiques sont soit effectrices (en rouge) ou initiatrices (en vert). B: Structure cristallographique de la caspase-3 mature complexée avec un inhibiteur (en jaune). La caspase active est un tétramère d'une grande (en rouge) et d'une petite (en bleu) sous-unité, chacune d'entre elles contribuant au site actif. C: L'activation de la caspase-3 par clivage protéolytique.

Figure 39 : La famille des caspases

(d'après Zimmermann KC & al., 2001)

soit être recyclé à la membrane, soit dégradé par la voie lysosomiale. Il n'est pas clairement connu la raison du choix de la voie, mais la protéine Hrs est nécessaire au ciblage de MET vers le lysosome.

Enfin, pour être complet dans les processus d'internalisation de MET, l'activation des PKC a été montré pour induire la localisation péri-nucléaire du récepteur (Kermorgant et al., 2003; Kermorgant et al., 2004), qui pourrait être soit issue du blocage de récepteur néo-synthétisé au sein du Golgi, soit issue du trafic du récepteur MET.

Le trafic intracellulaire de MET est de mieux en mieux décrit et décortiqué, néanmoins, quelques zones d'ombre demeurent, comme le rôle du protéasome dans cette voie, le type de branchement de l'ubiquitine impliqué (mono, poly, K48, K63...), à la lumière des récentes découvertes sur l'ubiquitylation du récepteur à l'EGF (Huang et al., 2006) ou encore le choix du devenir du MET activé. Il est déjà certain que l'internalisation du récepteur n'a pas pour unique objectif de le dégrader, mais a également un rôle dans la signalisation, les partenaires étant différents selon la localisation du récepteur (Kermorgant and Parker, 2005).

II. L'apoptose

Le terme « mort cellulaire programmée » a été utilisé pour la première fois en 1964 pour décrire la mort reproductible de certaines cellules durant le développement d'insecte (Lockshin and Williams, 1965). Le terme « apoptose » émerge en 1972 et décrit les caractéristiques morphologiques communes observées lors de mort cellulaire dans des contextes très variés, incluant la mort cellulaire programmée décrite lors du développement, mais également la mort de cellules exposées à des toxines, des radiations, des infections virales ou à la privation en facteur de croissance (Kerr et al., 1972). Par ce terme, signifiant en grec « la chute des feuilles » en automne, l'auteur voulait désigner un type de mort différent de la nécrose, seule forme de mort caractérisée jusqu'alors. L'apoptose se caractérise par la formation de bourgeonnement à la surface cellulaire, une condensation de la chromatine, une fragmentation intranucléosomale de l'ADN, le maintien de l'intégrité des organelles et finalement la phagocytose de la cellule morte.

L'identification des acteurs moléculaires de la mort cellulaire programmée a été mise à jour durant le développement du nématode *Cænorhabditis elegans*, qui présente la particularité de voir mourir un nombre restreint et constant de cellules (Horvitz, 1999). Trois gènes majeurs ont été identifiés : le produit du gène *ced-3* est une cystéine protéase, baptisée

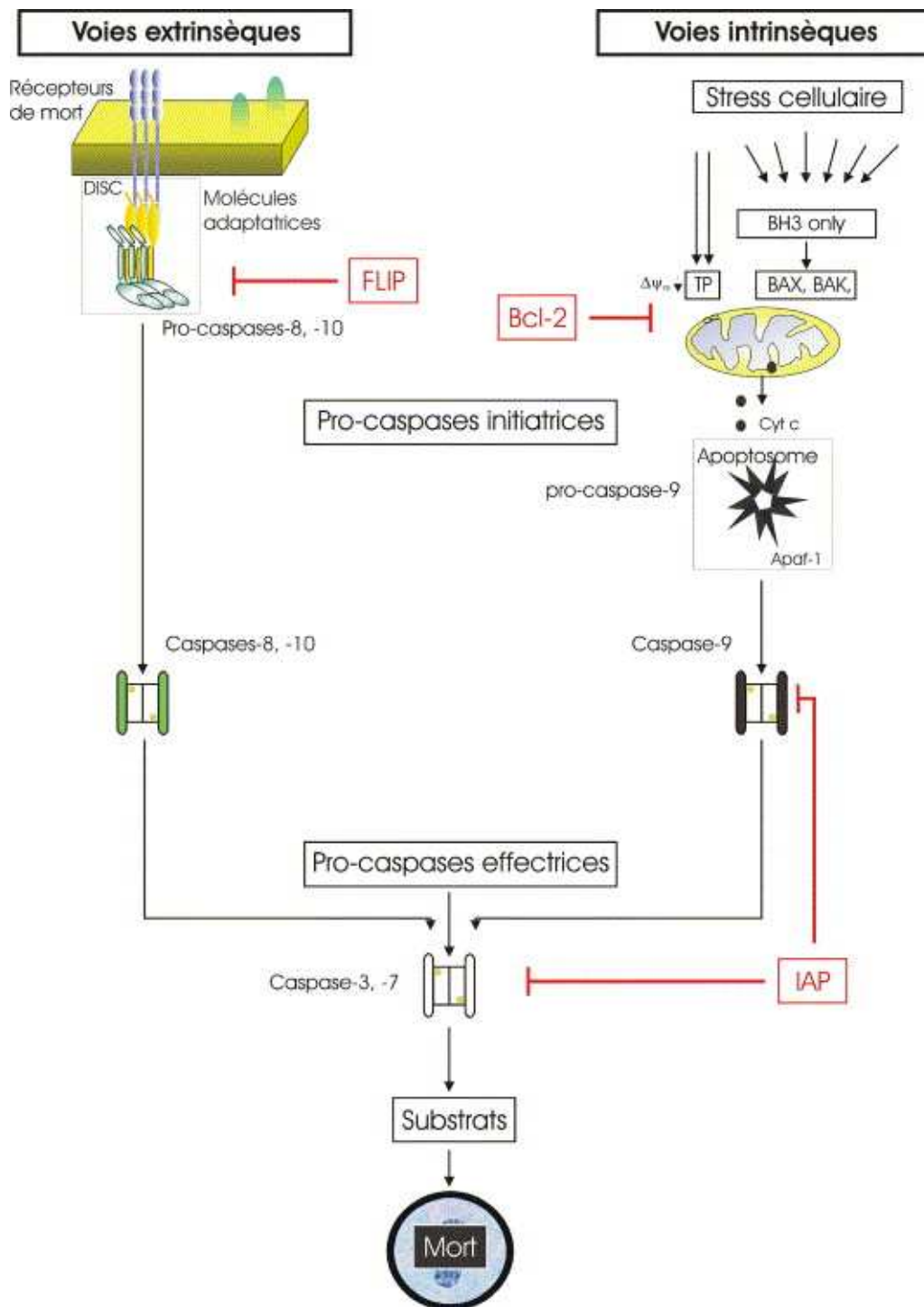


Figure 40 : Le puzzle apoptotique

(d'après Marchetti P., 2005)

caspase (cystéine et aspartate protéase) et nécessaire à la mort cellulaire programmée ; le produit du gène *ced-4* est une molécule adaptatrice pro-apoptotique, également nécessaire au processus d'apoptose ; en revanche, le produit du gène *ced-9* est une protéine inhibitrice de l'apoptose. La fonction de ces trois gènes donne une vision de la régulation et de l'exécution du programme de mort cellulaire : ce programme est régulé par un accélérateur Ced-4, et un frein Ced-9 ; l'exécution du programme est réalisée par Ced-3, qui va cliver de nombreux substrats et ainsi modifier leur activité.

Ultérieurement, il a été démontré que les homologues des trois gènes majeurs impliqués dans l'apoptose au cours du développement de *C. elegans* sont responsables de la mort cellulaire programmée chez les mammifères. Bien que les acteurs moléculaires y soient plus nombreux, le patron reste le même : l'exécution du programme par les caspases, finement régulées par des activateurs ou des répresseurs. Les homologues de Ced-3 forment la famille des caspases, riche de 12 membres chez l'homme (Fig. 39) (Nicholson, 1999; Zimmermann and Green, 2001), l'homologue de Ced-4 est APAF-1, une protéine impliquée dans l'induction de l'apoptose par son association avec le cytochrome C et la caspase-9. Enfin, les homologues de Ced-9 forment la famille des protéines Bcl, qui régulent négativement ou positivement l'apoptose.

La mise en place des éléments du puzzle apoptotique

(Figure 40)

a. La fragmentation oligonucléosomique de l'ADN résulte de l'activation de pro-caspases effectrices

Les caspases sont des cystéines protéases qui clivent spécifiquement leurs substrats après un motif tétrapeptidique se terminant par un aspartate (D) (Thornberry and Lazebnik, 1998). Les caspases sont exprimées sous forme de pro-enzymes inactives qui contiennent trois domaines séparés par des résidus aspartates, sites de clivage potentiel par les caspases elles-mêmes. Les caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7), sont appelées ainsi car elles participent activement à la destruction de la cellule apoptotique en clivant spécifiquement différents substrats cytosoliques et nucléaires. Plus de 100 protéines substrats des caspases effectrices ont été décrites lors de l'apoptose (Fischer et al., 2003). Une enzyme de réparation nucléaire,

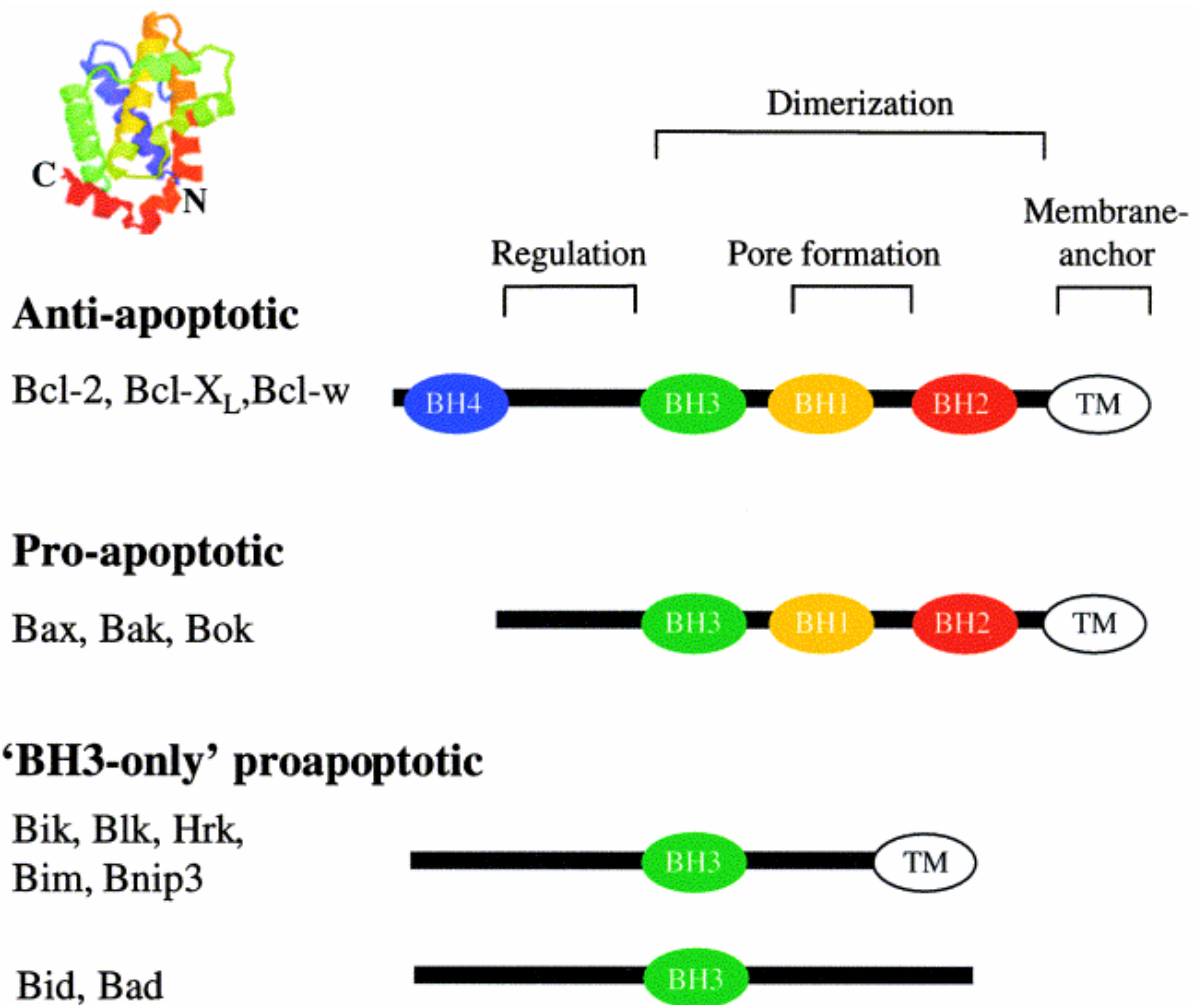
la PARP (Poly-ADP ribose polymérase), est la cible majeure du clivage protéolytique par les caspases effectrices qui l'inactivent. Citons également le clivage de protéines de l'architecture cellulaire comme l'actine, la gelsoline ou certaines laminines nucléaires, ou encore des régulateurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2. Les caspases sont régulées naturellement par des protéines de la famille des IAPs (Inhibitor of apoptosis proteins) (Salvesen and Duckett, 2002), dont il existe au moins 8 membres chez les mammifères. Les IAPs empêcheraient les conséquences de l'activation accidentelle ou spontanée des caspases en établissant un seuil à partir duquel les caspases peuvent dégrader la cellule.

b. La cascade d'activation des caspases : les pro-caspases effectrices sont activées par des caspases initiatrices

De manière générale, la maturation des pro-caspases pour obtenir des caspases actives pleinement fonctionnelles se fait par clivage protéolytique au niveau des résidus aspartates qui délimitent les trois domaines. Les caspases effectrices sont activées de manière hiérarchique, en cascade, par d'autres caspases initiatrices (caspases-2, -8, -9 et -10) (Adams and Cory, 2002; Thornberry and Lazebnik, 1998). Ainsi, le clivage protéolytique de la pro-caspase-3 survient sous l'effet direct des caspases-8 ou -9 activées. Plus rarement, l'activation protéolytique des caspases effectrices peut être secondaire à l'action d'autres protéases comme les granzymes B ou les cathepsines.

c. Les pro-caspases initiatrices sont capables de s'autoactiver

Les pro-caspases initiatrices sont caractérisées par la présence d'un long prodomaine (>10 kDa) possédant des motifs peptidiques impliqués dans des interactions avec d'autres protéines possédant ces domaines d'homologie. Ces interactions protéine-protéine ont pour conséquence le recrutement et l'agrégation sur un même site d'un nombre suffisant de caspases initiatrices capables de déclencher leur autoactivation. Ainsi, à l'origine de la réponse apoptotique réside l'autoactivation des pro-caspases initiatrices.



Trois sous-familles sont indiquées : les membres du groupe Bcl-2 favorisent la survie, alors que les autres favorisent l'apoptose. BH1-BH4 sont des motifs de séquence conservés. Les domaines fonctionnels de Bcl-2 sont indiqués. Le domaine d'ancrage à la membrane (TM) n'est pas présent chez tous les membres de la famille.

Figure 41 : Les membres de la famille Bcl-2

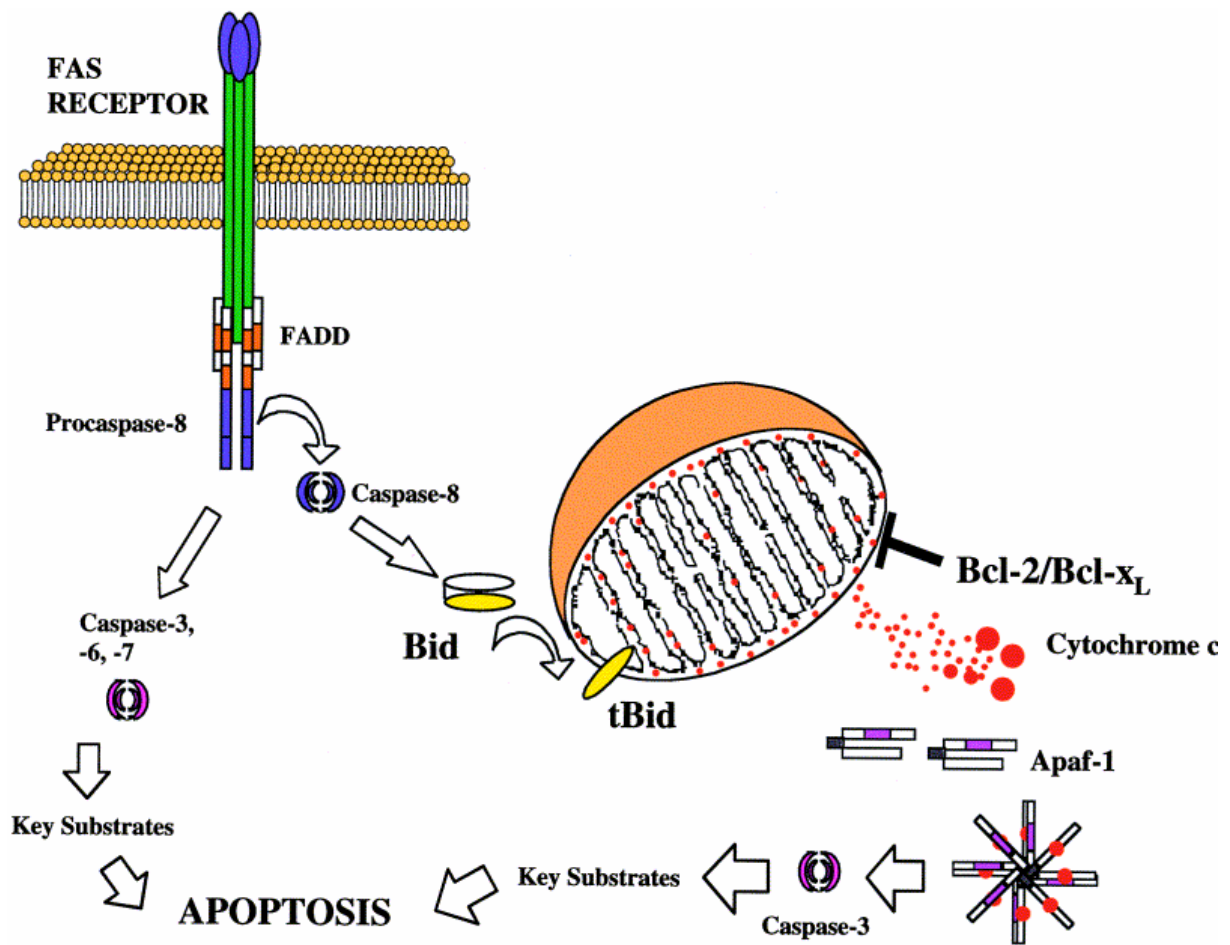
(d'après Zimmermann KC & al., 2001)

d. L'autoactivation des caspases initiatrices est secondaire à l'engagement des voies apoptotiques extrinsèques et intrinsèques

La nature des caspases initiatrices activées est déterminée par l'engagement de voies apoptotiques spécifiques. On distingue ainsi une voie intrinsèque mitochondriale conduisant à l'activation de la pro-caspase-9 d'une part, et d'autre part, une voie extrinsèque dépendante des récepteurs de mort conduisant à l'activation des caspases-8 et -10.

i Voie apoptotique intrinsèque

Les pro-caspases-9 s'autoactivent après agrégation au sein d'un complexe cytosolique multimoléculaire appelé apoptosome (Adams and Cory, 2002). Le cœur de la structure de l'apoptosome est une protéine cytoplasmique, APAF-1, homologue humain de Ced-4, qui change de conformation après interaction avec le cytochrome C en présence d'ATP. Ce changement conformationnel permet aux oligomères d'APAF-1 de recruter et d'autoactiver la pro-caspase-9. La formation de l'apoptosome est secondaire à la libération du cytochrome c, normalement situé dans l'espace intramembranaire mitochondrial, vers le cytosol. Celle-ci est déclenchée par une perméabilisation accrue de la membrane mitochondriale externe (MME), phénomène modulé par les protéines de la famille de Bcl-2 (Fig. 41). Cette famille contient des molécules anti-apoptotiques : Bcl-2, Bcl-X_L ; et des protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bak, Bad ou Bid. La perméabilisation de la MME peut être réalisée par deux mécanismes différents : la transition de perméabilité (Brenner and Kroemer, 2000; Green and Kroemer, 2004), ou la création d'un canal dans la MME par les protéines pro-apoptotiques (Cheng et al., 2001; Fadeel et al., 1999). Le ratio entre les protéines anti- et pro- apoptotiques de la famille Bcl-2 a été décrit comme le rhéostat de la vie et de la mort cellulaire. La voie intrinsèque de l'apoptose peut être induite par différents stress cellulaires, tel que des drogues, des cytotoxiques, des cassures de l'ADN, des rayonnements, de l'hypoxie, des stress osmotiques, thermiques...



L'activation de la pro-caspase-8 par Fas est illustrée. FasR recrute FADD par sa région intracellulaire, qui recrute à son tour la pro-caspase-8. La pro-caspase-8 s'autoactive et active ensuite la caspase-3, menant à l'apoptose. La caspase-8 peut également cliver la protéine Bid, qui induit le relargage du cytochrome C par perméabilisation de la MME de la mitochondrie, ceci induit la formation de l'apoptosome et active l'apoptose.

Figure 42 : Activation d'un récepteur de mort

(d'après Zimmermann KC & al., 2001)

ii Voie apoptotique extrinsèque

L'activation des voies apoptotiques extrinsèques nécessite l'intervention des récepteurs de mort (DR pour Death receptor) de la superfamille du TNF- α (Tumor necrosis factor) (Schmitz et al., 2000). La famille des TNF-R est une famille de plus de 20 membres parmi lesquels les récepteurs de mort (DR1 à DR5) partagent des séquences d'homologie dans leur région intracytoplasmique responsables de la signalisation apoptotique. Parmi les récepteurs de mort, FAS (DR2) et TNF-R1 (DR1) sont les récepteurs qui ont été le plus étudiés. Les récepteurs FAS sont exprimés dans la majorité des types cellulaires, après fixation de leur ligand, ces récepteurs déclenchent une succession d'évènements moléculaires qui (Fig. 42) conduisent à l'oligomérisation des récepteurs transmembranaires qui permet le recrutement de protéines adaptatrices cytoplasmiques (FADD pour Fas associated death domain et/ou TRADD pour TNF receptor associated death domain) qui à leur tour vont recruter les pro-caspases initiatrices -8 et -10.

Cet ensemble multiprotéique impliquant ligands-récepteurs-protéines adaptatrices et pro-caspases initiatrices porte le nom de DISC (death-inducing signaling complex). Il s'ensuit l'activation autocatalytique des caspases initiatrices qui précipite la cellule vers une mort inéluctable. Cependant, la mort cellulaire peut être régulée au niveau des caspases initiatrices les plus en amont du processus apoptotique par les molécules FLIP (FLICE-inhibitory proteins). Ces protéines ont la capacité de rentrer en compétition avec les pro-caspases initiatrices, au niveau du DISC entraînant consécutivement une absence d'autoactivation des pro-caspases et l'arrêt de la propagation du signal en aval.

La description que j'ai faite du processus d'apoptose de manière linéaire est évidemment largement simplifiée par rapport à la réalité biologique. De nombreux moyens de régulations complexes s'ajoutent à ce processus, et l'on peut citer plus particulièrement certains niveaux déjà bien décrits :

- D'autres facteurs mitochondriaux pro-apoptotiques libérés par la mitochondrie sont nécessaires au déroulement de l'apoptose comme SMAC/Diablo (Du et al., 2000) ou Omi/HtrA2 (Suzuki et al., 2001; Verhagen et al., 2002)

- Les voies extrinsèques et intrinsèques communiquent (Fas peut dans certains cas activer la protéine Bid qui s'insère alors dans la MME (Nagata, 1999) (Fig. 42))
- L'apoptose peut être indépendante des caspases, et l'inhibition des caspases n'est pas capable d'éviter la mort cellulaire (deux effecteurs mitochondriaux indépendants des caspases ont été décrits : AIF (apoptosis inducing factor) (Susin et al., 1999) et l'endonucléase G (Li et al., 2001))
- Il existe de nombreuses boucles d'amplification (par exemple, la caspase-3 provoque des dommages mitochondriaux (Ricci et al., 2004))

Résultats

RESULTATS

A l'origine, le laboratoire étudiait le facteur de transcription ETS-1, montrant qu'il était une cible fonctionnelle du facteur de croissance HGF/SF qui participe notamment à l'induction de gènes de protéases favorisant la dispersion des cellules épithéliales (Fafeur et al., 1997). Ce fut le premier travail du laboratoire sur les mécanismes de signalisation de l'HGF/SF. Les travaux suivants ont permis de montrer que l'activation de ETS-1 par l'HGF/SF est médiée par la voie Ras, induisant une cascade de MAPK Ras-Raf-MEK-ERK (Paumelle et al., 2002). Cette voie de signalisation est impliquée dans des réponses biologiques multiples de l'HGF/SF, telle que la dispersion et la morphogenèse (Tulasne et al., 2002), mais aussi la survie (Paumelle et al., 2000; Reveneau et al., 2003). De plus, il était établi que les voies de signalisation en aval de MET et de l'HGF/SF passaient exclusivement par le domaine de recrutement multi-substrat C-terminal du récepteur, mais le laboratoire a montré que la voie Ras était activable indépendamment de ce site de recrutement multisubstrat (Tulasne et al., 1999).

Je suis arrivé au laboratoire pour y effectuer mon DEA (Master 2, désormais), à l'été 2001 et mes travaux se sont orientés sur le devenir du récepteur MET au cours de la balance survie/apoptose.

I. Article 1:

Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage.

David Tulasne, Julien Deheuninck, Filipe Calheiros Lourenço, Fabienne Lamballe, Zongling Ji, Catherine Leroy, Emilie Puchois, Anice Moumen, Flavio Maina, Patrick Mehlen, and Véronique Fafeur.

Mol Cell Biol. 2004 Dec;24(23):10328-39.

1. Introduction

Nous avons observé la génération reproductible d'un fragment de MET aux alentours de 40 kDa suite à des transfections transitoires de chimères TRK-MET et avons donc cherché par quel mécanisme ce fragment était généré. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques a permis de déterminer que ces fragments étaient issus d'un clivage par les caspases, protéases cellulaires activées au cours du processus d'apoptose. De fil en aiguille, nous avons compris que ce fragment visible après transfection transitoire, était dû au stress induit par la transfection dans les cellules MDCK.

Les résultats nous ont amenés à identifier le site de clivage par les caspases de MET dans la région juxtamembranaire, au sein d'une séquence ESVD, où la caspase-3 coupe le récepteur juste après l'acide aspartique D1000. Puis, la construction du fragment p40 MET a permis de montrer que ce fragment, contrairement au récepteur MET de pleine longueur, possédait des fonctions pro-apoptotiques.

Proapoptotic Function of the MET Tyrosine Kinase Receptor through Caspase Cleavage

David Tulasne,^{1*} Julien Deheuninck,¹ Filipe Calheiros Lourenço,² Fabienne Lamballe,³
Zongling Ji,¹ Catherine Leroy,¹ Emilie Puchois,¹ Anice Moumen,³ Flavio Maina,³
Patrick Mehlen,² and Véronique Fafeur¹

Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, Lille,¹ Université Claude Bernard, Villeurbanne,² and IBDM, Campus de Luminy, Marseille,³ France

Received 23 March 2004/Returned for modification 29 April 2004/Accepted 3 September 2004

The MET tyrosine kinase, the receptor of hepatocyte growth factor-scatter factor (HGF/SF), is known to be essential for normal development and cell survival. We report that stress stimuli induce the caspase-mediated cleavage of MET in physiological cellular targets, such as epithelial cells, embryonic hepatocytes, and cortical neurons. Cleavage occurs at aspartic residue 1000 within the SVD site of the juxtamembrane region, independently of the crucial docking tyrosine residues Y1001 or Y1347 and Y1354. This cleavage generates an intracellular 40-kDa MET fragment containing the kinase domain. The p40 MET fragment itself causes apoptosis of MDCK epithelial cells and embryonic cortical neurons, whereas its kinase-dead version is impaired in proapoptotic activity. Finally, HGF/SF treatment does not favor MET cleavage and apoptosis, confirming the known survival role of ligand-activated MET. Our results show that stress stimuli convert the MET survival receptor into a proapoptotic factor.

Hepatocyte growth factor-scatter factor (HGF/SF) is a pleiotropic growth factor that acts through the MET tyrosine kinase receptor in a variety of cell types (3, 20, 21, 30). The ligand-activated MET stimulates proliferation, scattering, invasion, and morphogenesis of epithelial cells and has chemoattractant and neurotrophic activities in different types of neurons. Targeted disruption of either the *hgf* or *met* gene reveals an essential role of the HGF/SF-MET system during development of the placenta, liver, muscles, and neurons (4, 17, 28, 34).

Whereas HGF/SF-MET signaling mediates a variety of physiological processes, aberrant HGF/SF-MET signaling contributes to tumor progression and metastasis (3). The MET receptor was originally isolated as the cellular counterpart of a transforming gene, *tpo-met* (22). HGF/SF and MET are overexpressed, often coexpressed, in a significant number of human cancers. In addition, activating MET mutations have been described in various cancers, including sporadic and hereditary papillary renal carcinoma (29). Such activating mutations in lymph nodal and pulmonary metastases further underline MET functions during metastatic progression (7, 16).

The survival property of the HGF/SF-MET couple has been shown with in vitro and in vivo systems. Indeed, phenotypic analysis of *hgf* or *met* null mice have shown that HGF/SF-MET signaling is essential for hepatocyte survival, since these mice display a severe reduction in the liver and show massive apoptosis (4, 28, 34). Moreover, in vitro HGF/SF protects a number of cell types against cell toxicity and apoptosis caused by various stimuli, including DNA-damaging agents, serum withdrawal, and activation of death receptors (11, 14, 42). However, HGF/SF was also found to induce apoptosis in sarcoma

180 cells and in some hepatic cell lines (1, 37). This result might be due to the ability of the MET receptor to interact with FAS, a death receptor, with high concentrations of HGF/SF, causing dissociation of the interaction and therefore sensitizing the cells to FAS-mediated apoptosis (37).

Upon HGF/SF binding, the MET receptor is dimerized and its tyrosine kinase activity is stimulated, with autophosphorylation of the receptor (21). Two phosphotyrosine residues located in the noncatalytic C-terminal tail of the receptor (Y1347 and Y1354 of mouse MET) have been identified as multifunctional docking sites, able to interact with several cytoplasmic signal transducers (26, 38). In most cases, phosphorylation of these tyrosine residues is crucial for mediating all biological responses to HGF/SF (8), although this phosphorylation was found to be dispensable for cell scattering in some studies (33). In contrast to the positive signaling triggered by the C-terminal tail, the juxtamembrane region is endowed with several negative regulatory sites, which are involved in down-regulation and/or degradation of the receptor (6, 9, 24, 36).

In this study, we examined the fate of the MET receptor in cells exposed to stress conditions. This resulted in a juxtamembrane caspase-dependent cleavage of the MET receptor, generating an intracellular 40-kDa fragment containing the tyrosine kinase domain. Expression of the 40-kDa MET fragment, displaying intact kinase activity, was found to be sufficient to cause apoptosis. Our data show that stress stimuli convert the antiapoptotic function of MET to a proapoptotic function by caspase-dependent cleavage.

MATERIALS AND METHODS

Cytokines, drugs, and epithelial-cell cultures. Human recombinant HGF/SF, beta nerve growth factor (β -NGF), and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were purchased from R&D Systems. Anisomycin was purchased from Calbiochem, and cycloheximide was purchased from ICN Biomedicals. The general caspase inhibitor zVAD-FMK was purchased from Promega. Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells were cultured in Dulbecco's modified

* Corresponding author. Mailing address: CNRS UMR 8117, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, B.P. 447, 59021 Lille, France. Phone: 00 33 3 20 87 10 91. Fax: 00 33 3 20 87 11 11. E-mail: david.tulasne@ibl.fr.

Eagle's medium (DMEM; Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics at 37°C. NMUMG cells (mammary gland, normal epithelial, mouse; American Type Culture Collection) were cultured in the same medium supplemented with 10 µg of insulin from bovine pancreas (Sigma)/ml.

Culture of cortical neurons. Neocortices were removed from 15.5-day-old Cdl mouse embryos, incubated for 15 min in trypsin, and then mechanically dissociated by pipetting them in DMEM-F-12 medium (Invitrogen) supplemented with antibiotics and 10% horse serum (Sigma). The cells were then submitted to electroporation as described below. For biochemistry, the dissociated cells were seeded on poly-DL-ornithine-coated 6-cm-diameter dishes (Falcon) at a density of 6×10^6 /dish in DMEM-horse serum. Four hours later, the medium was removed and replaced by neurobasal medium supplemented with B27 nutrient (Invitrogen).

Culture of hepatocytes. Embryonic hepatocyte cultures were performed as previously described (18). Briefly, dissected embryonic day 15.5 livers were treated with collagenase, debris was removed by filtration, and cells were collected by centrifugation. Hepatocytes were seeded on collagen-coated dishes in hepatocyte attachment medium (Invitrogen) supplemented with 2% FCS, 10 µg of insulin/ml, and 50 ng of epidermal growth factor/ml. The cells were starved for 16 h before biochemical studies were performed.

Plasmid construction. The LEX-MET fusions were constructed as follows. The HindIII/EcoRI restriction fragment, corresponding to the dimerization domain of LEX of pLEXA (Clontech Laboratories), was cloned in the mammalian expression vector pcDNA3 (Invitrogen). The full-length cytoplasmic domain of mouse MET was amplified by PCR using the primer 5' TATCCGGGAATT CCTGTGGATG 3', containing the EcoRI restriction site, and primer 5' TCA TCTAGACCCTAGCCATCAATG 3', containing the XbaI restriction site. The full cytoplasmic domain of MET was cloned in frame with LEX in pcDNA3 using the EcoRI/XbaI sites. The LEX-MET protein in which aspartic acid 1000 was mutated to glutamic acid (LEX-MET D1000N) was created using the Quick-Change site-directed mutagenesis system from Stratagene, using wild-type (WT) LEX-MET as a template and the following primers: 5' TCAATGAGTCTGT AAACACAGAGCTACT 3' and 5' AGTAGCTCTGTAGTTTACAGACTCA TTTGA 3'. Insertion of the mutation was verified by sequencing.

The TRK-MET chimeras were previously described (40). We modified these vectors by introducing a C-terminal V5 epitope. The TRK-MET expression vector allow the expression of an extracellular TRKA receptor fused to transmembrane and cytoplasmic regions of mouse MET, an activity inducible by NGF. The original TRK-MET chimeras in the pBAT expression vector were cloned in the pcDNA 3.1 V5-His C plasmid (Invitrogen) as follows. The TRK sequence, up to the BamHI restriction site, was cut out by digestion using HindIII and BamHI restriction enzymes and cloned into the pcDNA 3.1 V5-His plasmid. The remaining TRK-MET sequence, from the BamHI restriction site to the 3' end, was amplified by PCR using the primer 5' GCAGCCGGCTGGA TCCTCACAGAGCTGG 3', containing the BamHI restriction site, and primer 5' GGGCCTCTCATTCTCGAGTGTCCCC 3', containing the XhoI restriction site, using pBAT TRK-MET WT, Y1347-1354F, Y1001F, or K1108A as a template. The PCR product was subcloned into a pGEM plasmid (pGEM Easy kit; Stratagene). MET in which aspartic acid 1000 was mutated to glutamic acid was created using the QuickChange site-directed mutagenesis system from Stratagene, using pGEM MET WT as a template and the following primers: 5' TCA AATGAGTCTGTAACTACAGAGCTACT 3' and 5' AGTAGCTCTGTAG TTTACAGACTCATTGGA 3'. Insertion of the mutation was verified by sequencing. Finally, MET sequence from pGEM was inserted in pcDNA3 TRK using BamHI and XhoI restriction sites.

The N-terminal Flag-cleaved MET (p40 MET) and the kinase-dead (KD) version (p40 MET K1108A) were constructed as follows. Mouse MET from the caspase site to the C-terminal end was amplified by PCR using TRK-MET WT and TRK-MET K1108A, described previously (40), as templates and the primer 5' GAGTCTGTAGGATCCAGAGCTAC 3', containing the BamHI restriction site, and the primer 5' GGGCCTCTAGACCCTAGCCATC 3', containing the XbaI restriction site. The sequence obtained was cloned using BamHI/XbaI in frame with Flag sequence in the pcDNA3 vector.

Antibodies. Mouse monoclonal antibody directed against the C-terminal tail of mouse c-MET (B-2) and rabbit polyclonal antibody against Erk2 (C-14) were purchased from Santa Cruz. Mouse monoclonal antibody directed against the kinase domain of MET (25H2) and rabbit polyclonal antibody against cleaved caspase 3 were purchased from Cell Signaling Technology. Rabbit polyclonal antibody against phosphorylated tyrosines 1234 and 1235 of the MET kinase domain was purchased from Upstate Biotechnology. Mouse monoclonal antibody against Flag sequence (M5) was purchased from Sigma. Peroxidase-, fluorescein-, and rhodamine-conjugated antibodies directed against rabbit and

mouse immunoglobulin G (IgG) were purchased from Jackson Immunoresearch Laboratories.

In vitro translation and caspase cleavage reaction. In vitro translations and caspase cleavage assays of LEX-MET and the corresponding mutant LEX-MET D1000N were performed as previously described (19) using TNT reticulocyte lysate (Promega). Purified active caspases were generously provided by G. S. Salvesen (The Burnham Institute, La Jolla, Calif.).

Transfection. Transient transfections of MDCK cells were performed as described previously using the lipofection method (33). Cortical neurons (8×10^4 cells) were electroporated in cold phosphate-buffered saline in the presence of 4 µg of DNA. The parameters for electroporation were 270 V and five pulses of 3 ms each. The cells were then placed on ice for 10 min and then seeded on poly-DL-ornithine-coated wells (Lab-Tek). Four hours later, the medium was removed and replaced by neurobasal medium supplemented with B27 nutrient medium.

Western blotting. MDCK or NMUMG cells (4×10^5 /35-mm-diameter dish), transfected or not, were cultured for 1 day in DMEM-10% FCS and treated with TNF-α-cycloheximide, anisomycin, or HGF/SF in serum-free DMEM or left untreated. Mouse embryonic hepatocytes and cortical neurons were cultured for 3 days and treated with 5 µM camptothecin, actinomycin D, or TNF-α or left untreated. The cells were then lysed, and the protein concentration was determined by a Bio-Rad protein assay. Western blotting was performed as described previously (23). The results presented are representative of at least two experiments.

Immunofluorescence. MDCK cells (10^5 /24-mm-diameter dish) were cultured for 1 day in DMEM-10% FCS on glass coverslips and transiently transfected as described above. At the end of the experiment, the cells were washed, fixed with 3% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and blocked with 10% goat serum for 20 min. The cells were incubated for 30 min with a combination of mouse anti-Flag antibody (10 µg/ml) and rabbit anti-active caspase 3 antibody (1:100). The cells were then washed and incubated with a combination of fluorescein-conjugated anti-mouse IgG (7 µg/ml) and rhodamine-conjugated anti-rabbit IgG (7 µg/ml). The cell nuclei were counterstained using Hoechst 33258. Coverslips were mounted with Glycergel mounting medium (Dako), and fluorescence was examined using a Zeiss Axioplan2. The results presented are representative of three experiments.

Caspase 3 activity. Caspase 3 activity was monitored using Ac-DEVD-pNA as a substrate (caspase 3 cellular activity assay kit; Calbiochem). The activity was determined according to the manufacturer's instructions.

TUNEL staining. Thirty-six hours after electroporation, cortical neurons were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100. Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) staining (Apoptag in situ apoptosis detection kit; Serologicals Corp.) was then performed according to the manufacturer's instructions. The coverslips were mounted in Vectashield-DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) (Vector).

RESULTS

Stress stimuli induce the generation of an intracellular 40-kDa C-terminal fragment of MET. In order to check the fate of MET exposed to stress conditions, primary cultures of embryonic day 15.5 mouse hepatocytes and cortical neurons were treated with TNF-α-actinomycin D or camptothecin, respectively. These stress stimuli were found to cause activation of caspase 3 and increase of TUNEL-positive cells in both cell types within 12 to 18 h (Fig. 1B and D). Under these proapoptotic conditions, an additional protein of ~40 kDa (p40 MET) was detected by using an anti-mouse MET antibody (Fig. 1A and C).

We also investigated the generation of p40 MET in epithelial cell lines, such as MDCK renal cells and NMUMG mammary cells, treated with either TNF-α-cycloheximide or anisomycin. These stress stimuli were found to cause massive cell detachment and activation of caspase 3 in both cell types within 12 to 24 h. These effects correlated with the generation of p40 MET and a decrease in full-length MET receptor detection in MDCK cells (Fig. 2A). In a time course experiment, the earliest detection of p40 MET occurred 4 h after anisomy-

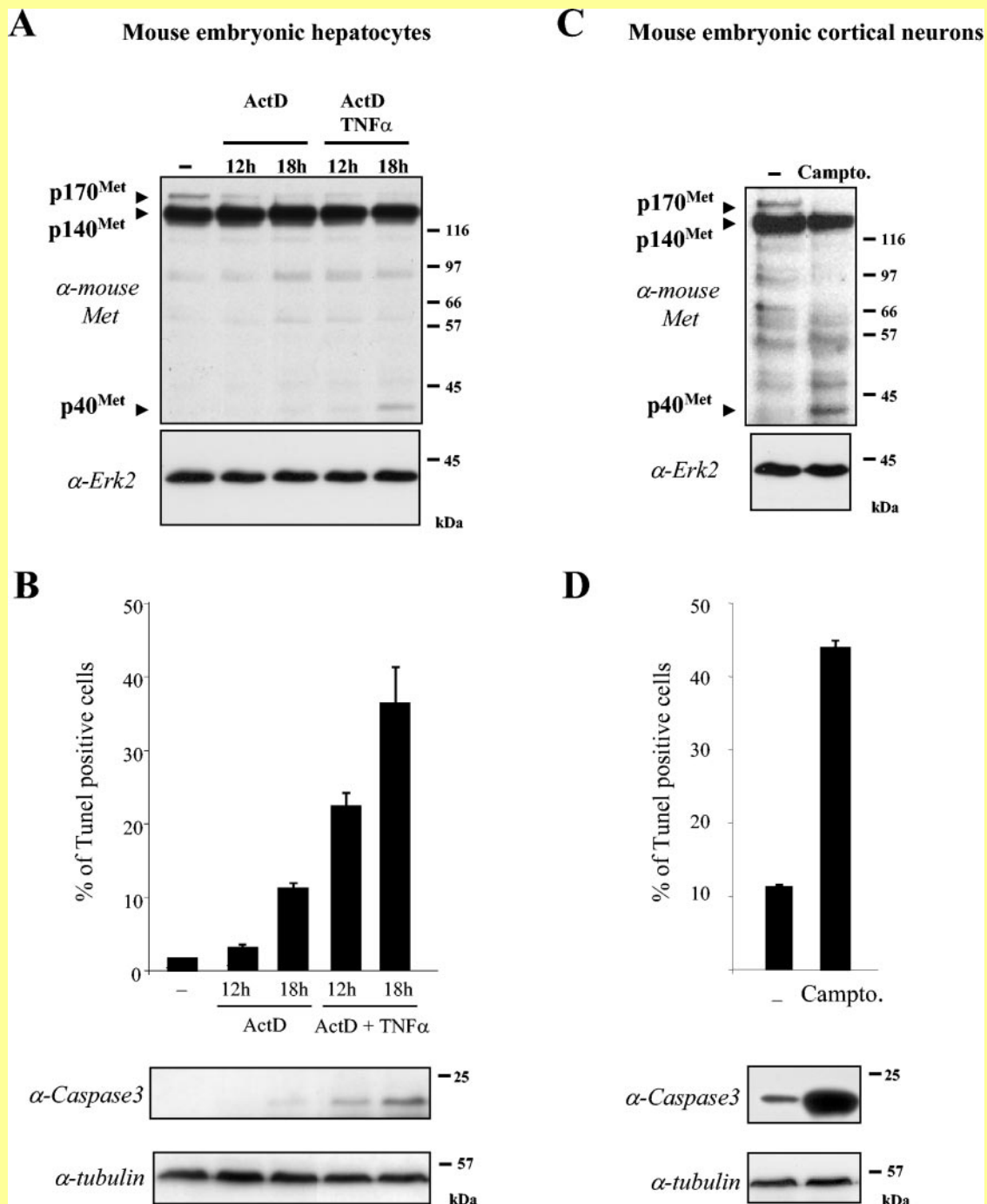


FIG. 1. Stress stimuli generate a p40 MET fragment in primary cultures of mouse hepatocytes and cortical neurons. (A) Hepatocytes were cultured for 3 days and treated for 12 or 18 h with actinomycin D or actinomycin D plus TNF- α (100 ng/ml) or left untreated (-). For each condition, the same amount of protein was resolved by SDS-10% PAGE and analyzed by Western blotting using antibodies directed against the C-terminal tail of mouse MET. The filter was stripped and reprobed using an anti-Erk2 antibody to assess comparable loading. (B) Percentages of TUNEL-positive hepatocytes over total number of hepatocytes were determined ($n = 3$; plus standard deviation [SD]). Protein was resolved by SDS-10% PAGE and analyzed by Western blotting using anti-cleaved caspase 3 antibody. The filter was stripped and reprobed using an anti- α -tubulin antibody to assess comparable loading. (C) Cortical neurons were cultured for 3 days and treated for 12 h with camptothecin (Campto.; 5 μ M) or left untreated (-). For each condition, the same amount of protein was resolved by SDS-10% PAGE and analyzed by Western blotting using antibodies directed against the C-terminal tail of mouse MET. The filter was stripped and reprobed using an anti-Erk2 antibody to assess comparable loading. (D) Percentages of TUNEL-positive cells over total number of cells were determined ($n = 3$; plus SD). Protein was resolved by SDS-10% PAGE and analyzed by Western blotting using anti-cleaved caspase 3 antibody. The filter was stripped and reprobed using an anti- α -tubulin antibody to assess comparable loading. The arrowheads indicate the positions of the MET precursor p170, MET β subunit p140, and MET p40 fragment. Although expression of p140 MET is higher than that of p170 MET, it appears that degradation of full-length MET is more pronounced for the p170 MET precursor than for the fully glycosylated p140 MET β subunit, suggesting that mature glycosylated receptors are more resistant to degradation.

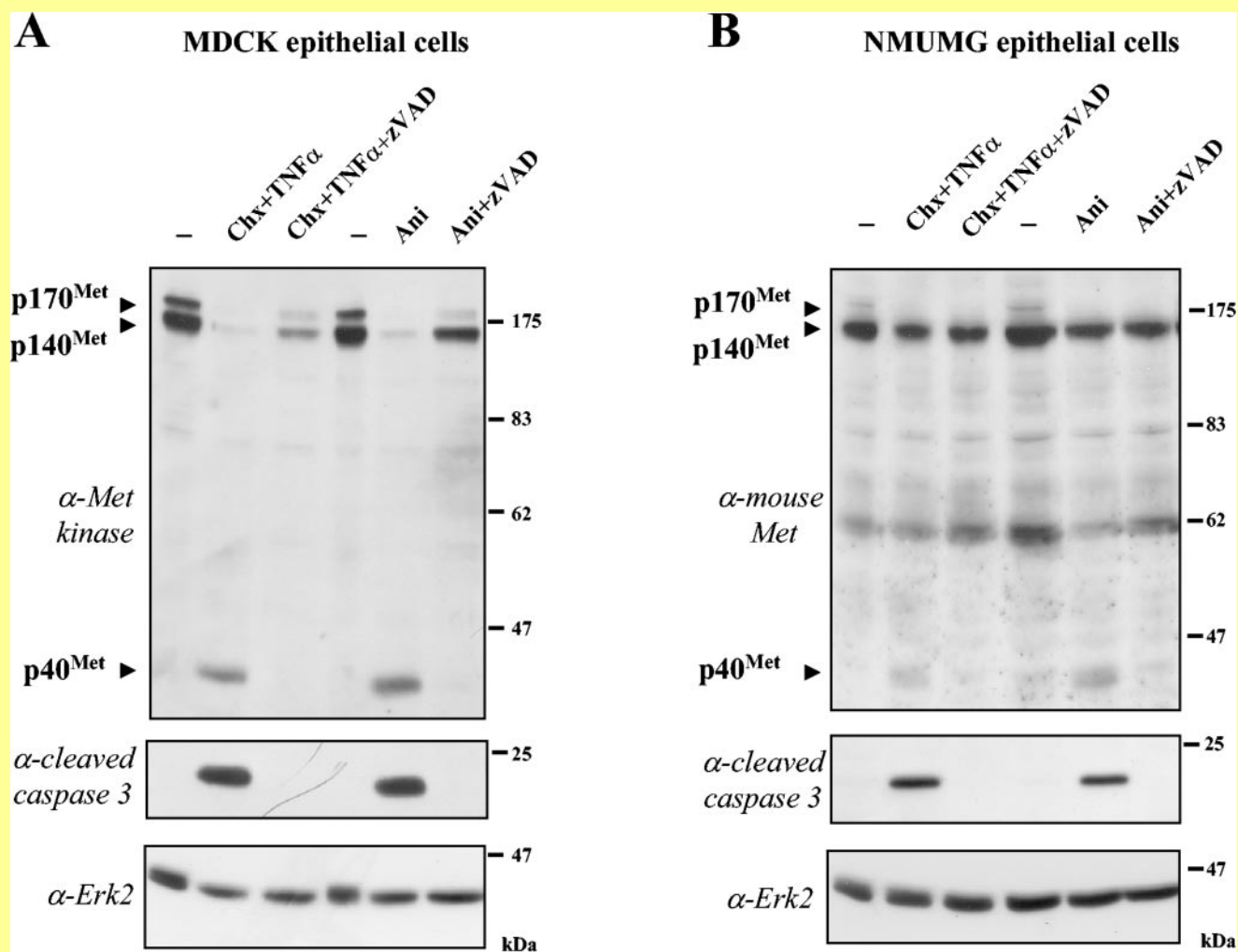


FIG. 2. Caspase inhibitor prevents p40 MET generation. (A) MDCK epithelial cells were treated for 12 h with either TNF- α (30 ng/ml)-cycloheximide (Chx; 10 μ g/ml) or anisomycin (Ani; 50 μ M) in the presence or absence of zVAD-FMK (zVAD; 20 μ M) or left untreated (-). For each condition, the same amount of protein was resolved by SDS-10% PAGE and analyzed by Western blotting using an anti-MET antibody directed against its kinase domain. The filter was stripped and reprobed sequentially using an anti-cleaved caspase 3 antibody and an anti-Erk2 antibody to assess loading. (B) NMUMG epithelial cells were treated as for panel A. Protein extracts were analyzed by Western blotting using antibody directed against the C-terminal tail of mouse MET. The filter was stripped and reprobed using an anti-Erk2 antibody. The same extracts were analyzed by Western blotting using an anti-cleaved caspase 3 antibody. The arrowheads indicate the positions of the MET precursor p170, MET subunit p140, and MET p40 fragment.

cin treatment, in correlation with activated caspase 3 (data not shown). Decreased MET expression and generation of p40 MET were also obtained in NMUMG cells, albeit in a less pronounced manner (Fig. 2B). Since the 40-kDa fragment was recognized by antibodies directed against either the MET kinase domain (Fig. 2A) or the MET C-terminal tail (Fig. 1A and C and 2B), we can conclude that p40 MET is an intracellular C-terminal fragment of MET.

Furthermore, treatment of both epithelial-cell types with the general caspase inhibitor Z-VAD-FMK abolished generation of the p40 MET fragment and partially restored expression of MET, showing that p40 MET generation is caspase dependent (Fig. 2).

Taken together, these results show that the MET receptor is cleaved by apoptotic proteases under stress conditions, leading

to the generation of an intracellular 40-kDa MET C-terminal fragment.

p40 MET is generated by caspase cleavage both in vitro and in living cells. The size of the p40 MET fragment suggests that the MET receptor is cleaved within its juxtamembrane domain. This region contains several negative regulatory sites involved in down-regulation and/or degradation of the receptor, including a protein kinase C phosphorylation site (Ser 983) (9), a PEST sequence (amino acids 986 to 1001) (6), a phosphatase-binding region (amino acids 993 to 1007) (36), and a c-CBL binding site (Tyr-1001) (24) (Fig. 3).

We further mapped the sequence 998-SVD-1000 (Fig. 3), which is a site for caspase cleavage identified in other proteins, such as RET (5), DCC (19), and TRAF3 (13). To check whether MET is a caspase substrate, we constructed a constitutive di-

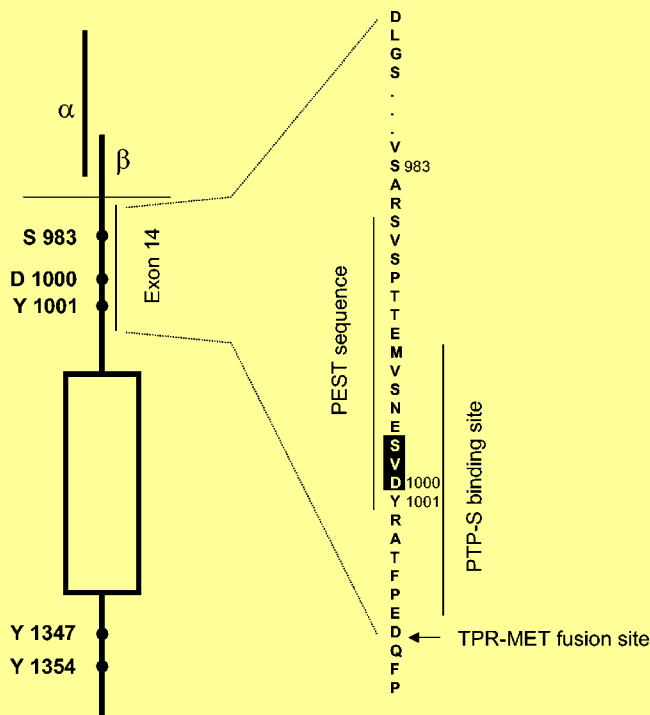


FIG. 3. Schematic representation of the α and β subunits of the mature mouse MET receptor. The tyrosine-phosphorylated docking sites Y1001 and Y1347-Y1354 located in the juxtamembrane and the C-terminal tail, respectively, are shown, as well as the protein kinase C phosphorylation site (S983). Exon 14, encoding part of the juxtamembrane domain, and the putative 998-SVD-1000 caspase site (black square), the PEST sequence, the PTP-S binding site, and the TPR-MET fusion site are indicated.

merized form of MET by fusing the intracellular domain of mouse MET to the dimerization domain of LEX (LEX-MET), resulting in a 70-kDa fusion protein. This LEX-MET fusion translated *in vitro* was incubated with purified caspases. Caspase 3, but not caspase 8, was able to cleave intracellular MET, generating two main fragments of \sim 40 and 30 kDa, which together correspond to the 70-kDa LEX-MET protein (Fig. 4). In contrast, no fragment was produced when aspartic acid of the putative caspase site was replaced by asparagine (D1000N).

We next investigated whether caspase cleavage of MET occurs at aspartic acid 1000 when cells are exposed to stress conditions. Experiments were performed using TRK-MET chimeric receptors, which have been shown to mediate MET-specific signals in epithelial cells in response to NGF (39, 40). These chimeras consist of the extracellular portion of the human TRK-A receptor coupled to the transmembrane and intracellular domains of mouse MET, resulting in a 150-kDa fusion protein. Transfected TRK-MET was detected by using an anti-mouse MET antibody, which does not detect endogenous canine MET. Anisomycin induced generation of the C-terminal p40 MET fragment from wild-type TRK-MET receptors. In contrast, the fragment was not generated from the TRK-MET D1000N mutant (Fig. 5). These results demonstrated that the intracellular 40-kDa MET fragment, containing the kinase domain and extending to the C-terminal tail, is generated by caspase cleavage at aspartic acid 1000 within the juxtamembrane domain.

We further asked whether tyrosine kinase activity and crucial tyrosine residues of MET are necessary for caspase cleavage. These include tyrosine residues Y1347 and Y1354 of the C-terminal region of MET, which mediate the recruitment of cytoplasmic signal transducers and most biological responses (26, 38), and tyrosine residue 1001, which is essential for ligand-induced CBL-mediated ubiquitination of MET (24, 25). As for wild-type TRK-MET, anisomycin induced the generation of p40 MET from TRK-MET receptors mutated either on C-terminal tyrosine residues (TRK-MET Y1347-1354F) or on juxtamembrane tyrosine residue 1001 (TRK-MET Y1001F) (Fig. 5). These results demonstrated that cleavage of MET does not require the known tyrosine docking sites of MET for downstream signaling proteins.

The p40 MET fragment was also generated from kinase-dead TRK-MET (K1108A), but in a less pronounced manner. It is worth noticing that anisomycin treatment caused decreased detection of kinase-dead TRK-MET, in contrast to all other TRK-MET chimeras used. This could be explained by the absence of survival signals triggered by kinase-dead TRK-MET, which could therefore not compensate for apoptosis induced by anisomycin, in contrast to other chimeras.

Furthermore, the generated p40 MET was detected as a smear for all TRK-MET and as a faint single band for the kinase-dead TRK-MET (Fig. 5, upper panel). The upper bands correspond to phosphorylated forms, as demonstrated using an anti-phosphorylated MET antibody (Fig. 5, upper middle panel). This shows that p40 MET generated from transfected TRK-MET receptor is tyrosine phosphorylated.

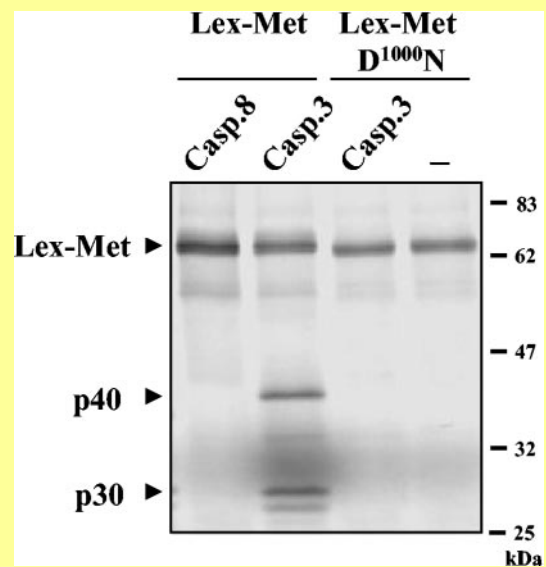


FIG. 4. Aspartic acid 1000 of MET is necessary for caspase 3 *in vitro* cleavage. The *in vitro*-translated full intracellular domain of MET WT fused to LEX sequence (LEX-MET) or mutated on aspartic acid 1000 (LEX-MET D1000-N) was incubated with or without (–) caspase 8 (0.3 μ M) or caspase 3 (0.3 μ M) for 2 h. Caspase 3 treatment generated p40 and p30 fragments, and their formation was impaired using the D1000N LEX-MET mutant. Two minor fragments of \sim 35 and 25 kDa were also generated by caspase 3 treatment; these fragments might be generated from smaller *in vitro* translation products of LEX-MET. The arrowheads indicate the positions of the LEX-MET, p40, and p30 fragments.

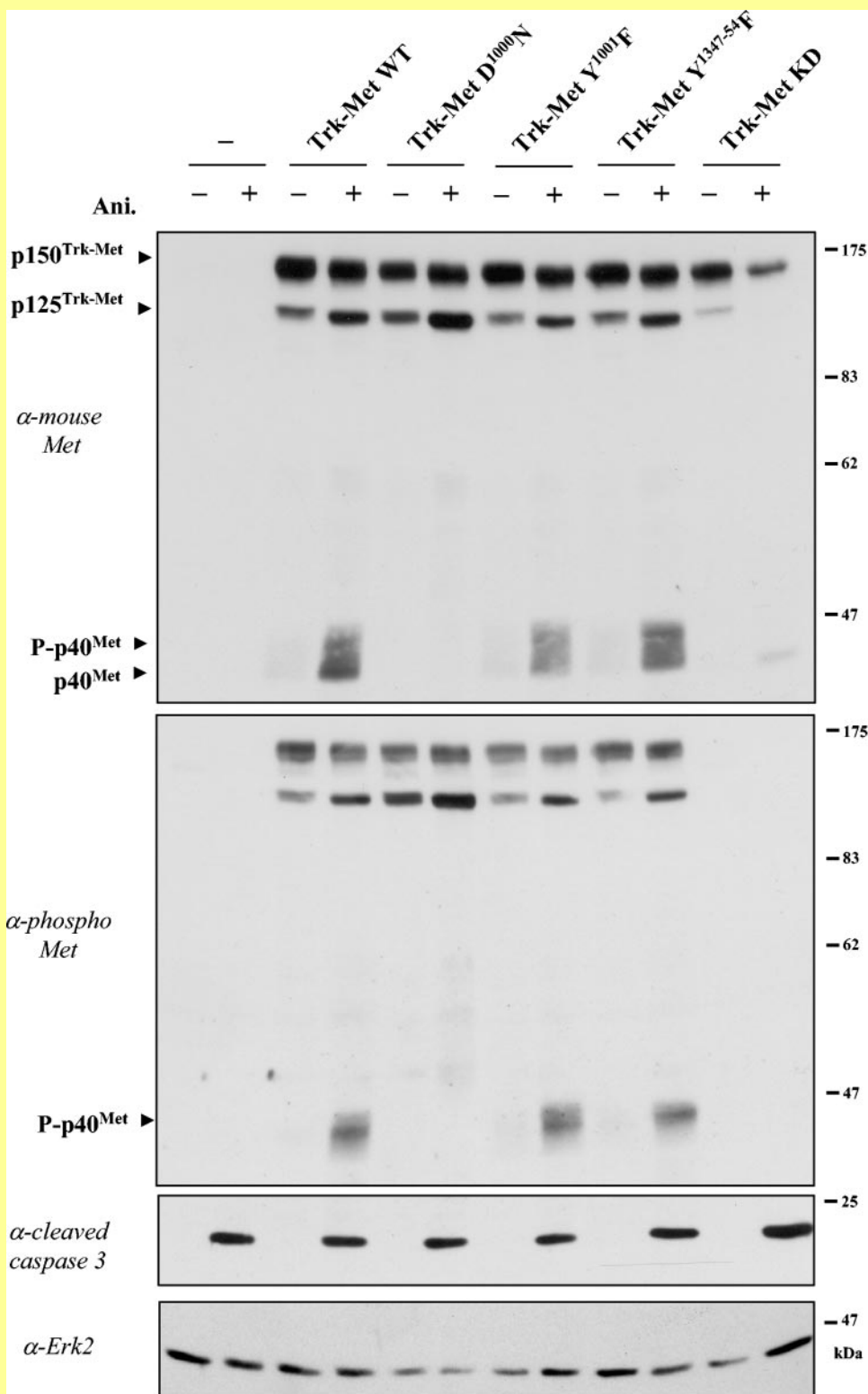


FIG. 5. Generation of p40 MET requires aspartic acid 1000 but does not require functional docking sites. MDCK cells were transiently transfected with 1 μ g of vector/ml, either empty (-) or expressing TRK-MET receptor, WT, mutated on aspartic acid 1000 (D1000N), mutated on tyrosine residues (Y1001F or Y1347-1354F), or kinase dead (TRK-MET KD). The following day, the cells were treated for 6 h with anisomycin (Ani.; 50 μ M) (+) or left untreated (-). For each condition, the same amount of protein was resolved by SDS-10% PAGE and analyzed by Western blotting using an antibody directed against the C-terminal tail of mouse MET (upper panel). The filter was stripped and reprobed sequentially using an anti-phospho-MET antibody (upper middle panel) and an anti-Erk2 antibody (lower panel). The same extracts were analyzed by Western blotting using an anti-cleaved caspase 3 antibody (lower middle panel). The arrowheads indicate the positions of the p150 TRK-MET (fully glycosylated) and p125 TRK-MET (partially glycosylated) and phosphorylated (P-p40 MET) and nonphosphorylated p40 MET fragments.

Kinase-active p40 MET is sufficient to induce apoptosis. In order to evaluate the biological relevance of p40 MET, we engineered Flag-tagged versions of wild-type and kinase-dead p40 MET (p40 MET KD). Following their transfection into MDCK cells and analysis by Western blotting using an anti-Flag antibody, p40 MET was detected as a doublet, with the upper band corresponding to its phosphorylated form, and kinase-dead p40 MET was detected as an unphosphorylated singlet band (Fig. 6A). Interestingly, expression of cleaved caspase 3 was induced only by wild-type p40 MET (Fig. 6A).

Immunofluorescence analysis revealed that wild-type and kinase-dead p40 MET are expressed in both the cytoplasm and the nucleus. p40 MET-expressing cells were compact, and Hoechst staining showed characteristic signs of apoptosis such as condensed DNA or a strong decrease in DNA content. About 25% of p40 MET-transfected cells were positive for cleaved caspase 3 staining (Fig. 6B, left). In contrast, kinase-dead p40 MET-expressing cells display normal morphology, with ~5% cleaved caspase 3-positive cells (Fig. 6B, right).

We next asked whether proapoptotic activity of p40 MET would also occur in primary-culture cells. Mouse embryonic cortical neurons were electroporated with empty vector or wild-type or kinase-dead p40 MET. Thirty-six hours after electroporation, apoptosis was assessed by DNA fragmentation using both DAPI staining and TUNEL reaction. Immunostaining with an anti-Flag antibody showed that an average of 70% of cortical neurons were indeed electroporated (data not shown). p40 MET-transfected cells display a high percentage of TUNEL-positive cells (45%) compared to levels of apoptosis in cortical neurons transfected with either empty vector or kinase-dead p40 MET (Fig. 7). As a control, comparable levels of apoptotic cells (55%) were obtained by electroporation of Forkhead, a known apoptosis inducer (data not shown).

These results show that expression of p40 MET is sufficient to cause apoptosis of either MDCK epithelial cells or embryonic cortical neurons, even in the absence of stress stimuli. In addition, this effect is an active process, since the proapoptotic function of p40 MET requires its intact tyrosine kinase activity.

HGF/SF treatment does not favor generation of p40 MET. The proapoptotic function of p40 MET contrasts with the well-known survival function of the MET receptor against stress stimuli. To unravel these opposite functions of MET kinase, we asked whether HGF/SF stimulation could prevent the generation of p40 MET, thus preventing its proapoptotic activity. MDCK cells were treated with anisomycin in the presence or absence of HGF/SF or left untreated. Stimulation by HGF/SF prevented the generation of anisomycin-mediated p40 MET in a dose-dependent manner (Fig. 8). Consistently, this event was associated with reduced caspase 3 activation.

Similar results were obtained by exploring the effects of HGF/SF at doses below 1 ng/ml or above 10 ng/ml (data not shown). Protection was also found using MDCK cells stably expressing TRK-MET receptors and stimulated by NGF (data not shown). This provided evidence of a balance between the actions of HGF/SF and stress stimuli, with HGF/SF acting through the MET receptor and mediating an antiapoptotic input, whereas stress conditions generated p40 MET, which by itself mediates a proapoptotic input.

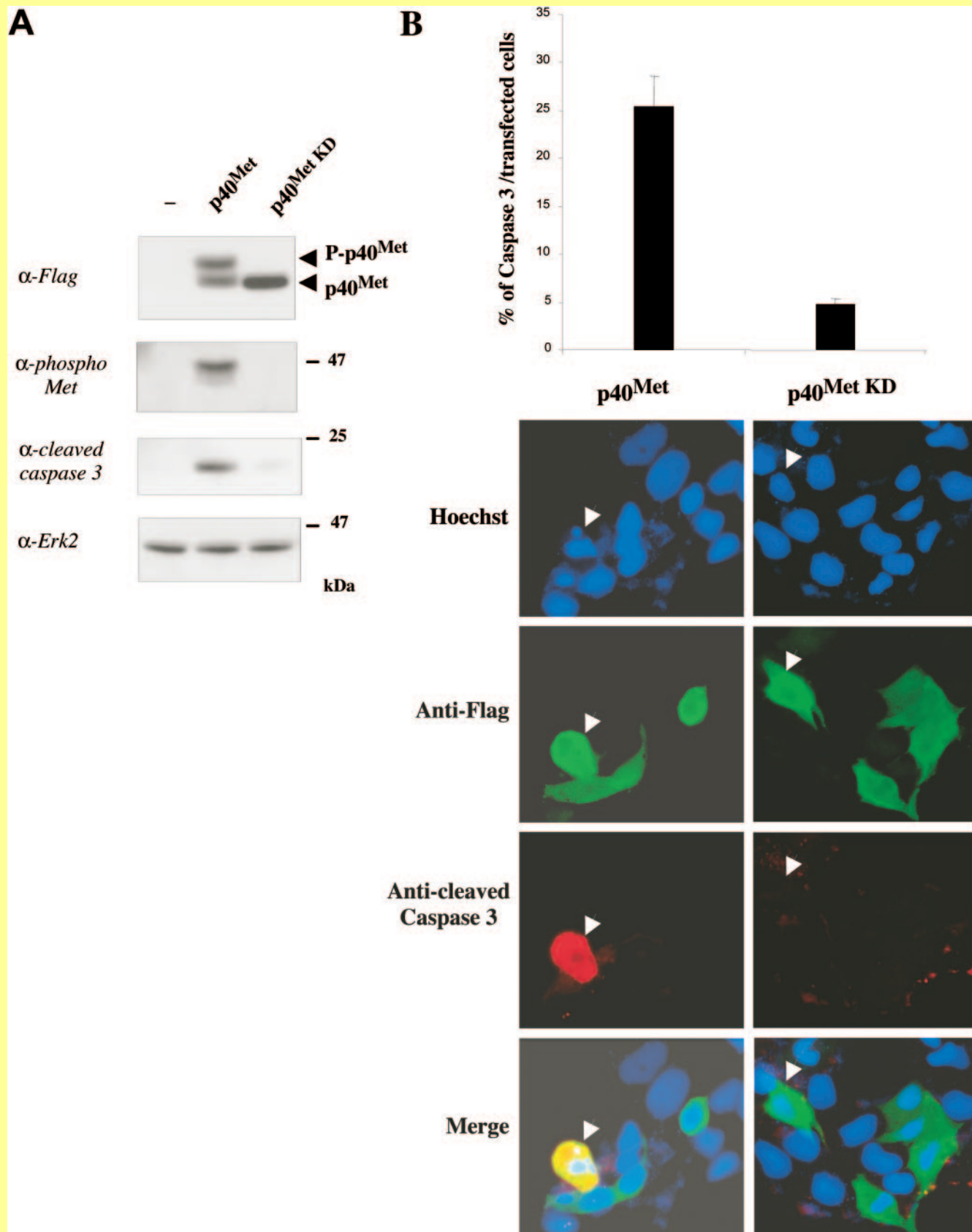
DISCUSSION

Activation of the MET tyrosine kinase receptor by HGF/SF is classically associated with cell survival against various stress stimuli. Nonetheless, we demonstrated that stress stimuli can also lead to caspase-dependent cleavage that converts MET into a proapoptotic factor.

The caspase cleavage site is located in the juxtamembrane region of MET, an essential negative regulatory region (Fig. 3). Initial evidence for the role of this region, came from the identification of MET proteins lacking exon 14, including the TPR-MET oncogenic version of MET. TPR-MET comes from a chromosomal rearrangement, which creates a fusion protein between TPR (providing two leucine zipper domains) and intracellular MET, resulting in a constitutive dimerized and therefore activated MET kinase (22). In this TPR-MET fusion, the intracellular portion of the MET receptor is conserved, with the notable exception of exon 14, encoding part of the juxtamembrane region. The transforming activity of TPR-MET was lost when exon 14 was reintroduced into the TPR-MET sequence (35). In mouse tissue, this exon 14 is also absent in an alternative spliced form of MET, which causes aberrant MET signaling (12). More direct evidence for the relevance of the juxtamembrane region came from the identification of several negative regulatory sites. These included a protein kinase C phosphorylation site (Ser 983), which negatively regulates MET kinase activity (9); a PEST sequence (amino acids 986 to 1001), which can confer susceptibility to intracellular proteolysis (amino acids 986 to 1001) (6); a sequence (amino acids 993 to 1007) associated with phosphatase activity (36); and a c-CBL binding site (Tyr-1001) responsible for MET ubiquitination and proteasomal degradation (24).

The caspase cleavage site (Asp-1000) identified here is an additional novel negative regulatory site within the juxtamembrane region of MET. Indeed, the cleavage releases a p40 fragment containing the kinase domain, which becomes ligand independent and acquires proapoptotic activity. Its putative counterpart, p100 MET, which includes the extracellular region and part of the juxtamembrane region, was not detected

FIG. 6. p40 MET expression induces apoptosis of MDCK epithelial cells. (A) MDCK cells were transiently transfected with 1 μ g of vector/ml, either empty (–) or expressing wild-type (p40 Met) or kinase-dead (p40 Met KD) p40 MET. Forty-eight hours after transfection, the proteins were resolved by SDS–10% PAGE and analyzed by Western blotting using an anti-Flag antibody (top). The filter was stripped and reprobed sequentially using an anti-phospho-MET antibody and an anti-Erk2 antibody. The same extracts were analyzed by Western blotting using an anti-active caspase 3 antibody. The arrowheads indicate the positions of phosphorylated and nonphosphorylated p40 MET. (B) MDCK cells were transfected with 1 μ g of vector/ml expressing either wild-type (p40 Met) or kinase-dead (p40 Met KD) p40 MET. Twenty-four hours after transfection, nuclei were detected by using Hoechst staining (Hoechst; blue staining) and immunofluorescence assays were performed using an anti-Flag antibody (Anti-Flag; green staining) and an anti-cleaved caspase 3 antibody (Anti-cleaved Caspase 3; red staining). An overlay of the three stains is shown (Merge). Percentages of caspase 3-positive cells over p40 MET WT- or KD-transfected cells were determined ($n = 3$; plus standard deviation). The white arrowheads indicate representative cells expressing transfected p40 MET WT or KD.



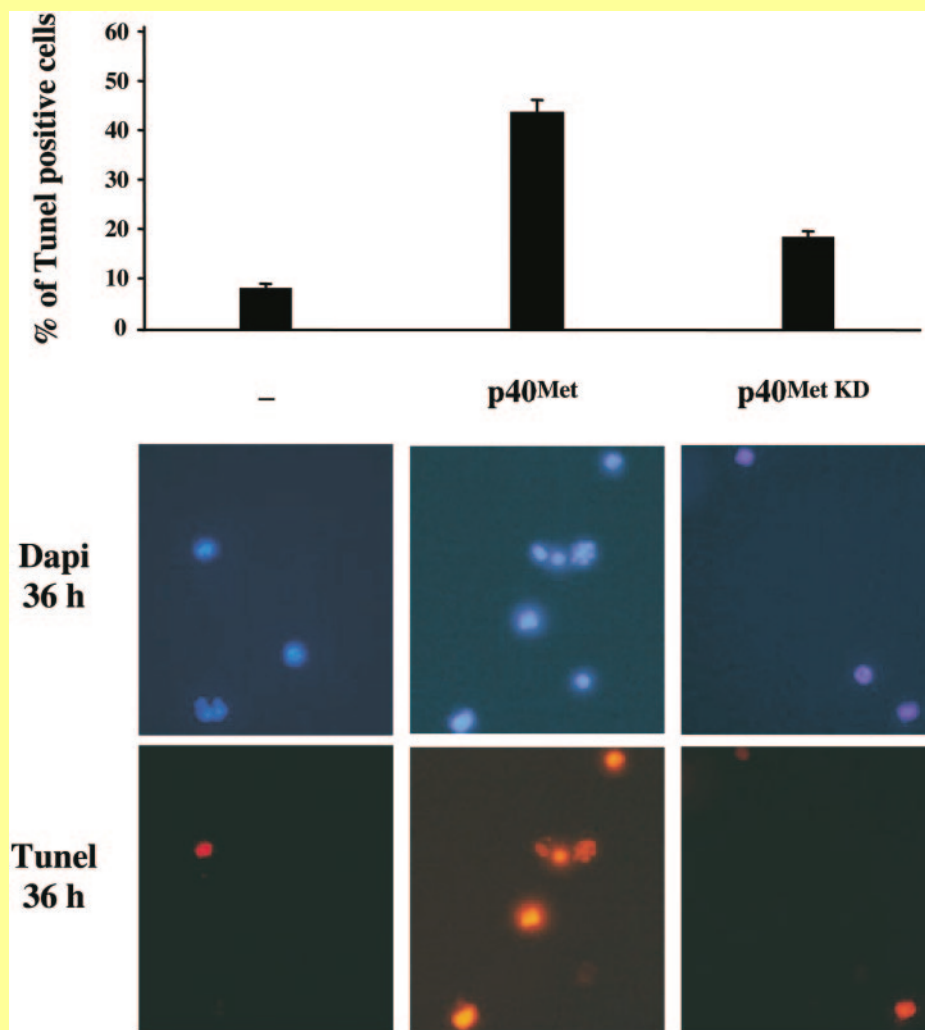


FIG. 7. p40 MET expression induces apoptosis of embryonic cortical neurons. After dissociation, mouse embryonic cortical neurons were electroporated with either empty vector or wild-type (p40 Met) or kinase-dead (p40 Met KD) p40 MET. Thirty-six hours after transfection, TUNEL staining was performed and nuclei were detected using DAPI staining. Percentages of TUNEL-positive cells over the total number of cells were determined ($n = 3$; plus standard deviation). Representative DAPI and TUNEL staining is shown. The arrows indicate representative DNA condensation in apoptotic cells.

in canine MDCK cells by using currently available antibodies. Nonetheless, both p40 and p100 MET could be detected in human epithelial cells exposed to stress conditions (unpublished observations), confirming the possibility that caspase cleavage splits the receptor. The biological relevance of p100 MET is being investigated. More importantly, we have provided evidence that this caspase cleavage site operates in situations and/or through mechanisms distinct from those of all other sites previously described. In particular, the caspase cleavage site is effective in the absence of the ligand, whereas all other sites are involved in down-regulation and/or degradation of the receptor following activation by the ligand. Accordingly, HGF/SF induced activation, ubiquitination, and proteasomal degradation of the receptor with a strict requirement for intact tyrosine kinase activity (10, 31). In contrast, stress stimuli induced both cleavage and degradation of MET with tyrosine kinase activity being dispensable, since kinase-dead MET receptors were still cleaved. Finally, Asp-1000 is

adjacent to Tyr-1001, which is involved in the recruitment of c-CBL, leading to degradation of activated MET receptor (24). It was found that mutations of Tyr-1001 and surrounding amino acids, including Asp-1000, cause similar constitutive epithelial-cell scattering (40), probably through lack of degradation of activated MET receptor. These results suggest that Asp-1000 belongs to the binding site of c-CBL. However, our present data showing that mutation of Asp-1000, but not mutation of Tyr-1001, impairs the generation of p40 MET indicate that caspase-dependent cleavage of MET can occur independently of c-CBL recruitment.

In contrast to embryonic hepatocytes and cortical neurons, we found that stress stimuli induced a strong decrease in MET expression accompanying the generation of endogenous p40 MET in an MDCK epithelial cell line. In these cells, both cleavage and degradation of MET may be mediated by apoptotic proteases. However, a MET sequence mutated on the caspase site or cell treatment with the zVAD-FMK caspase

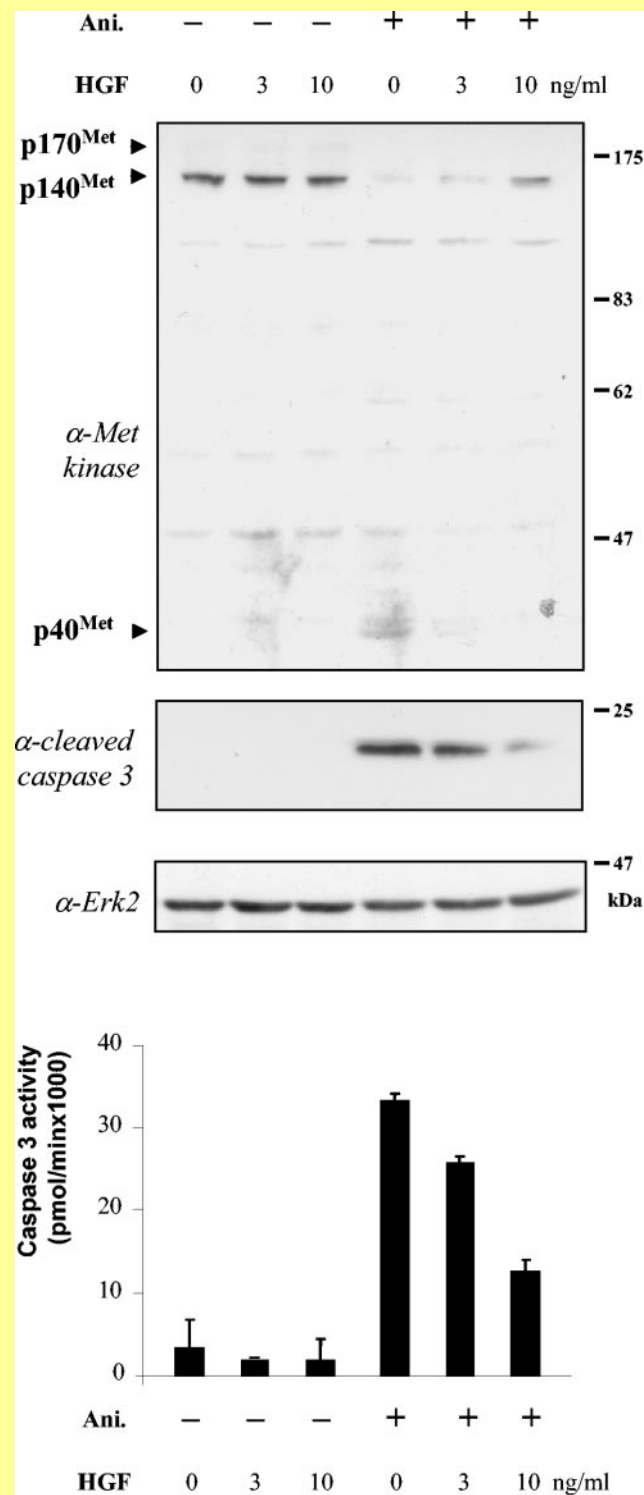


FIG. 8. HGF/SF stimulation of the MET receptor does not favor p40 MET generation. MDCK cells were pretreated for 1 h with HGF/SF at the concentration indicated or not pretreated (0) and then were treated for 8 h with anisomycin (Ani.; 50 μ M) (+) or left untreated (-). For each condition, caspase 3 activity was determined from the same amount of proteins ($n = 3$; plus standard deviation). Caspase activity is expressed as pmol/min of degraded substrate. A representative extract was resolved by SDS-10% PAGE and analyzed by Western blotting using an anti-MET antibody directed against the kinase domain. The filter was stripped and reprobed sequentially using an anti-active caspase 3 antibody and an anti-Erk2 antibody.

inhibitor abolished p40 MET generation but only partially restored MET expression. These results indicate that additional mechanisms degrade MET in MDCK epithelial cells under stress conditions, including proteolytic degradation through caspase-independent mechanisms. Furthermore, we found that the kinase-dead TRK-MET is more degraded than the other TRK-MET chimeras, with, however, a reduction in p40 MET production compared to the other chimeras. This suggests that other mechanisms of degradation can compete with the caspase-dependent cleavage of MET in epithelial-cell lines.

We cannot exclude the possibility that other proteases than caspase 3 can cleave MET under stress conditions. Nonetheless, we provide evidence for an amplification loop between generation of p40 MET and active caspase 3. Indeed, active caspase 3 generated p40 MET from MET *in vitro*, and transfected p40 MET induced the formation of active caspase 3, at least in epithelial cells. Furthermore, in all cell types examined, we found strict correlation between the level of p40 MET generation and caspase 3 activation. Altogether, these findings suggest the existence of a novel mechanism that makes use of MET signaling to accelerate apoptosis in cells exposed to stress conditions in the absence of HGF/SF.

By investigating the biological relevance of the p40 MET fragment, we found that p40 MET, but not its kinase-dead version, was able to induce apoptosis, demonstrating that tyrosine kinase activity is crucial for this process. This apoptotic capacity of a kinase-active form of p40 MET is further supported by phosphorylation of p40 MET, both endogenously generated from a transfected TRK-MET chimera and upon transfection of p40 MET. Because of their common intracellular sequences, it is reasonable to ask how active p40 MET can induce apoptosis whereas active full-length MET is known to favor survival. It is possible that p40 MET as a non-membrane-bound kinase does not signal like MET, and our preliminary results support this hypothesis. Indeed, we found that p40 MET does not activate ERK MAP kinase, a conventional target of survival pathways activated by MET (unpublished observations), but it may act on distinct apoptotic effectors which still need to be identified. We therefore speculate that p40 MET does not signal like MET but rather redirects the MET catalytic activity toward apoptosis, according to the cellular context of proapoptotic conditions.

The consequences of caspase cleavage are different depending on the substrates. In most cases, caspase cleavage is known to inactivate survival substrates. For instance, the tyrosine kinase receptors EGFR and ErbB2 are cleaved and inactivated by caspases during apoptosis (2, 32). Nonetheless, some substrates are activated by caspase cleavage, such as the MEKK1 serine-threonine kinase, which releases a C-terminal fragment containing the kinase domain that causes apoptosis (41). In line with such data, the MET survival receptor is converted to a proapoptotic p40 MET fragment.

Our results showing cleavage of MET by caspases generating a proapoptotic fragment and negative regulation of this process by its ligand are similar to previously reported data for the RET tyrosine kinase receptor and the DCC netrin-1 receptor and their respective ligands (5, 19). RET and DCC are further classified as dependence receptors. The overall concept of dependence receptors is that, in the absence of ligand, such

receptors are cleaved by caspases or other proteases and release or expose a proapoptotic domain that in turn leads to an increase of caspase activity and then more receptor cleavage (5, 15, 19). Thus, MET may behave like a dependence receptor. Nonetheless, current data do not show a proapoptotic effect of MET upon ectopic expression. Rather, we and others have found that ectopic MET expression induces positive downstream signaling involved in scattering, morphogenesis, and survival (8, 33) that masks a potential proapoptotic effect of cleaved MET.

In conclusion, we have provided evidence for a balance between HGF/SF leading to activation of the MET tyrosine kinase receptor and stress stimuli leading to the generation of p40 MET. Indeed, HGF/SF treatment counteracts caspase 3 activation in MDCK cells. This was accompanied by a decrease in p40 MET generation and restoration of full MET expression, suggesting an antiapoptotic function of ligand-activated MET that prevents its own cleavage by switching off caspase activation. Balance between apoptosis and survival is known to be crucial for a number of physiological and pathological processes. Accordingly, genetic invalidation of either MET or HGF/SF caused liver reduction with massive apoptosis (4, 28), while overexpression of HGF/SF in transgenic mice induced abnormal development and tumor formation in the liver (27). A critical balance between the antiapoptotic input of HGF/SF bound to MET and the proapoptotic input generated by MET caspase-dependent cleavage might be crucial for homeostasis triggered by HGF/SF and MET.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Institut Pasteur de Lille, the CNRS, and INSERM, and by grants from the Association Régionale pour l'Enseignement et la Recherche Scientifique et Technologique, the Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer, the Fondation de France, the Ligue Nationale contre le Cancer, the Association Française contre le Myopathies, the Fondation pour la Recherche Médicale, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Shlumberger Foundation, and NIH. A.M. was supported by a Ligue contre le Cancer fellowship.

REFERENCES

- Arakaki, N., J. A. Kazi, T. Kazihara, T. Ohnishi, and Y. Daikuhara. 1998. Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the apoptosis signaling pathway by increasing caspase-3 activity in sarcoma 180 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**:211–215.
- Bac, S. S., J. H. Choi, Y. S. Oh, D. K. Perry, S. H. Ryu, and P. G. Suh. 2001. Proteolytic cleavage of epidermal growth factor receptor by caspases. *FEBS Lett.* **491**:16–20.
- Birchmeier, C., W. Birchmeier, E. Gherardi, and G. F. Vande Woude. 2003. Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**:915–925.
- 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**:768–771.
- Bordeaux, M. C., C. Forcet, L. Granger, V. Corset, C. Bidaud, M. Billaud, D. E. Bredesen, P. Ederly, and P. Mehlen. 2000. The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *EMBO J.* **19**:4056–4063.
- Crepaldi, T., M. Prat, S. Giordano, E. Medico, and P. M. Comoglio. 1994. Generation of a truncated hepatocyte growth factor receptor in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **269**:1750–1755.
- Di Renzo, M. F., M. Olivero, T. Martone, A. Maffe, P. Maggiora, A. D. Stefani, G. Valente, S. Giordano, G. Cortesina, and P. M. Comoglio. 2000. Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. *Oncogene* **19**:1547–1555.
- Furge, K. A., Y. W. Zhang, and G. F. Vande Woude. 2000. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* **19**:5582–5589.
- 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. *J. Biol. Chem.* **269**:1815–1820.
- Jeffers, M., G. A. Taylor, K. M. Weidner, S. Omura, and G. F. Vande-Woude. 1997. Degradation of the Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol. Cell. Biol.* **17**:799–808.
- Kosai, K., K. Matsumoto, S. Nagata, Y. Tsujimoto, and T. Nakamura. 1998. Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**:683–690.
- Lee, C. C., and K. M. Yamada. 1995. Alternatively spliced juxtamembrane domain of a tyrosine kinase receptor is a multifunctional regulatory site. Deletion alters cellular tyrosine phosphorylation pattern and facilitates binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to the hepatocyte growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **270**:507–510.
- Lee, Z. H., S. E. Lee, K. Kwack, W. Yeo, T. H. Lee, S. S. Bae, P. G. Suh, and H. H. Kim. 2001. Caspase-mediated cleavage of TRAF3 in FasL-stimulated Jurkat-T cells. *J. Leukoc. Biol.* **69**:490–496.
- Liu, Y., A. M. Sun, and L. D. Dworkin. 1998. Hepatocyte growth factor protects renal epithelial cells from apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**:821–826.
- Llambi, F., F. Causeret, E. Bloch-Gallego, and P. Mehlen. 2001. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J.* **20**:2715–2722.
- Lorenzato, A., M. Olivero, S. Patane, E. Rosso, A. Oliaro, P. M. Comoglio, and M. F. Di Renzo. 2002. Novel somatic mutations of the MET oncogene in human carcinoma metastases activating cell motility and invasion. *Cancer Res.* **62**:7025–7030.
- Maina, F., M. C. Hilton, C. Ponzetto, A. M. Davies, and R. Klein. 1997. Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes Dev.* **11**:3341–3350.
- Maina, F., G. Pante, F. Helmbacher, R. Andres, A. Porthin, A. M. Davies, C. Ponzetto, and R. Klein. 2001. Coupling Met to specific pathways results in distinct developmental outcomes. *Mol. Cell* **7**:1293–1306.
- Mehlen, P., S. Rabizadeh, S. J. Snipas, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen, and D. E. Bredesen. 1998. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* **395**:801–804.
- Nakamura, T. 1991. Structure and function of hepatocyte growth factor. *Prog. Growth Factor Res.* **3**:67–85.
- Naldini, L., K. M. Weidner, E. Vigna, G. K. Gaudino, A. Bardelli, C. Ponzetto, R. P. Narsimhan, G. Hartmann, R. Zarnegar, G. Michalopoulos, W. Birchmeier, and P. M. Comoglio. 1991. Scatter factor and hepatocyte growth factor are undistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J.* **10**:2867–2878.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:6379–6383.
- Paumelle, R., D. Tulasne, Z. Kherrouche, S. Plaza, C. Leroy, S. Reveneau, B. Vandebunder, and V. Fafeur. 2002. Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene* **21**:2309–2319.
- 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. *Mol. Cell* **8**:995–1004.
- Petrelli, A., G. F. Gilestro, S. Lanzardo, P. M. Comoglio, N. Migone, and S. Giordano. 2002. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* **416**:187–190.
- Ponzetto, C., A. Bardelli, Z. Zhen, F. Maina, P. dalla Zonca, S. Giordano, A. Graaziani, 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**:261–271.
- Sakata, H., H. Takayama, R. Sharp, J. S. Rubin, G. Merlino, and W. J. LaRochelle. 1996. Hepatocyte growth factor/scatter factor overexpression induces growth, abnormal development, and tumor formation in transgenic mouse livers. *Cell Growth Differ.* **7**:1513–1523.
- 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**:699–702.
- Schmidt, L., F. M. Duh, F. Chen, T. Kishida, G. Glenn, P. Choyke, S. W. Scherer, Z. Zhuang, I. Lubensky, M. Dean, R. Allikmets, A. Chidambaram, U. R. Bergerheim, J. T. Feltis, C. Casadevall, A. Zamarron, M. Bernues, S. Richard, C. J. Lips, M. M. Walther, L. C. Tsui, L. Geil, M. L. Orcutt, T. Stackhouse, B. Zbar, et al. 1997. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat. Genet.* **16**:68–73.
- Stoker, M., and M. Perryman. 1985. An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J. Cell Sci.* **77**:209–223.
- Taher, T. E., E. P. Tjin, E. A. Beuling, J. Borst, M. Spaargaren, and S. T. Pals. 2002. c-Cbl is involved in Met signaling in B cells and mediates hepatocyte growth factor-induced receptor ubiquitination. *J. Immunol.* **169**:3793–3800.
- Tikhomirov, O., and G. Carpenter. 2001. Caspase-dependent cleavage of ErbB-2 by geldanamycin and staurosporin. *J. Biol. Chem.* **276**:33675–33680.

33. **Tulasne, D., R. Paumelle, K. M. Weidner, B. Vandenbunder, and V. Fafeur.** 1999. The multisubstrate docking site of the MET receptor is dispensable for MET-mediated RAS signaling and cell scattering. *Mol. Biol. Cell* **10**:551–565.
34. **Uehara, Y., O. Minowa, C. Mori, K. Shlota, J. Kuno, T. Noda, and N. Kitamura.** 1995. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* **373**:702–705.
35. **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**:4275–4281.
36. **Villa-Moruzzi, E., F. Puntoni, A. Bardelli, E. Vigna, S. De Rosa, and P. M. Comoglio.** 1998. Protein tyrosine phosphatase PTP-S binds to the juxtamembrane region of the hepatocyte growth factor receptor Met. *Biochem. J.* **336**: 235–239.
37. **Wang, X., M. C. DeFrances, Y. Dai, P. Pediaditakis, C. Johnson, A. Bell, G. K. Michalopoulos, and R. Zarnegar.** 2002. A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol. Cell* **9**:411–421.
38. **Weidner, K. M., S. Dicesare, 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**:173–176.
39. **Weidner, K. M., G. Hartmann, L. Naldini, P. M. Comoglio, M. Sachs, C. Fonatsch, H. Rieder, and W. Birchmeier.** 1993. Molecular characteristics of HGF-SF and its role in cell motility and invasion. *EXS* **65**:311–328.
40. **Weidner, K. M., M. Sachs, and W. Birchmeier.** 1995. Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:2597–2601.
41. **Widmann, C., P. Gerwins, N. L. Johnson, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson.** 1998. MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **18**:2416–2429.
42. **Yo, Y., R. Morishita, S. Nakamura, N. Tomita, K. Yamamoto, A. Moriguchi, K. Matsumoto, T. Nakamura, J. Higaki, and T. Oghara.** 1998. Potential role of hepatocyte growth factor in the maintenance of renal structure: anti-apoptotic action of HGF on epithelial cells. *Kidney Int.* **54**:1128–1138.

2. Conclusion

Ces travaux ont permis de montrer que le récepteur tyrosine kinase MET est un substrat des caspases au cours du processus d'apoptose. Nous avons pu identifier le site de clivage qui est localisé dans la région juxtamembranaire du récepteur, constitué d'une séquence ESVD¹⁰⁰⁰. Enfin, une expression ectopique du fragment cytosolique généré p40 MET a permis de montrer une fonction pro-apoptotique de ce fragment.

Ces résultats ont initié une nouvelle thématique de recherche au sein du laboratoire, et ont permis l'émergence de nouveaux travaux autour de ce résultat princeps.

Le clivage caspase de MET dans sa région juxtamembranaire doit couper le récepteur en deux fragments inégaux : le fragment cytosolique p40 MET, et un fragment majoritairement extra-cellulaire, bien que toujours ancré à la membrane par son domaine transmembranaire. Nous nous sommes donc intéressés à cette contrepartie potentielle de p40 MET, et ces travaux vous sont présentés dans le second article.

II. Article 2:

Caspase cleavage of the Met tyrosine kinase generates a natural decoy receptor.

Julien Deheuninck, Bénédicte Foveau, Catherine Leroy, Zongling Ji, David Tulasne et
Véronique Fafeur.

1. Introduction

La découverte d'un site de clivage par les caspases dans la région juxtamembranaire du récepteur MET, et l'apparition d'un fragment de 40 kDa, pouvait laisser augurer de la présence d'une contrepartie d'environ 100 kDa (140kDa – 40kDa). Afin de détecter ce fragment potentiel, il nous a fallu changer nos modèles d'études pour des raisons techniques : l'essentiel des travaux sur l'apoptose et p40 MET était effectué dans les cellules MDCK d'origine canine, or les anticorps dirigés contre la région extracellulaire de MET commercialement disponible sont spécifiques du MET d'origine humaine, et de fait ne permettait aucune détection issue du MET canin endogène. De plus, nous utilisons principalement les constructions TRK-MET, et nous ne possédons aucun anticorps efficace pour reconnaître la partie extracellulaire du récepteur TRK A. Ainsi, nous n'avons pas détecté immédiatement la contrepartie de p40 MET. Ce fragment p100 MET a pu être détecté de manière endogène, grâce à l'utilisation de cellules humaines, les cellules Hela.

Une fois ce fragment clairement apparu, il nous est apparu intéressant d'investiguer son potentiel et son rôle dans le processus d'apoptose. J'ai donc cloné un fragment p100 MET d'origine murine, car le fragment p40 MET que nous avons cloné était lui aussi murin. Ce fragment p100 MET a été fusionné dans sa région C-terminale à une étiquette V5, afin de pouvoir l'immunoprécipiter et le détecter en immunoblot. Grâce à cette construction, nous avons cherché à déterminer la fonction biologique d'un tel fragment.

GENERATION OF A NATURAL MET DECOY RECEPTOR BY CASPASE CLEAVAGE

Julien DEHEUNINCK, Bénédicte FOVEAU, Catherine LEROY, Zongling JI, David TULASNE and Véronique FAFEUR.

Running title: A natural MET decoy receptor

Corresponding author : Véronique FAFEUR, CNRS UMR 8161, Institut de biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr Calmette, 59000 Lille, FRANCE. Phone : 33- 320 87 10 91. Fax : 33- 320 87 11 11. E-mail : veronique.fafeur@ibl.fr

Abstract

Hepatocyte growth factor/ scatter factor (HGF/SF) acts through the MET tyrosine kinase receptor to promote survival and proliferation of epithelial cells during normal development and tumor progression. Nonetheless, we recently demonstrated that stress stimuli cause a caspase-dependent cleavage of MET, which converts the MET receptor into a pro-apoptotic cytoplasmic fragment of 40 kDa, p40 MET. Here, we evidenced the endogenous counterpart of p40 MET, p100 MET, which corresponds to the whole extracellular part of MET receptor still spanning the membrane. Stress stimuli were found to generate both p100 and p40 MET fragments, through the ESVD caspase cleavage site located within the juxtamembrane region of MET. Upon ectopic expression, p100 MET can homodimerize and can prevent transcriptional responses induced by either HGF/SF or MET signaling. These data identify p100 MET as a natural decoy receptor, which can prevent both HGF/SF-induced and ligand-independent MET signaling.

Introduction

Hepatocyte growth factor / Scatter factor (HGF/SF) is the ligand of the MET tyrosine kinase receptor, which was first identified as an oncogene (see (1)). HGF/SF and MET signaling induce proliferative and anti-apoptotic responses in various cell types, as well as scattering and morphogenic responses in epithelial cells. Gene knockouts of either HGF/SF or MET allow to demonstrate their essential role in embryonic development. Deregulated HGF/SF-MET signaling is involved in tumor development and progression, in particular by promoting invasion and metastasis (see (2)). In numerous tumors, HGF/SF and/or MET are overexpressed leading to constitutive activation of MET signaling.

Moreover, activating mutations of MET have been identified in hereditary form of papillary renal carcinoma, that directly implicate MET in human cancer (3). Activating mutations were subsequently found in several cancers and metastatic lesions (4).

The MET receptor consists of an extracellular α chain (50 kDa) and a membrane spanning β chain (140 kDa) linked by disulfide bonds, which are derived from a 170 kDa single-chain precursor by intracellular proteolytic cleavage. The extracellular part of MET is composed of three domains, which share sequence homology with the semaphorin and plexin families of proteins (5). The N-terminal 500 amino acids fold into a Sema domain, conserved in all semaphorins and plexins, which contains the whole α subunit and the N-terminal end of the β subunit. This Sema domain interacts with HGF/SF and is required for receptor dimerization and activation (6-8). Adjacent to the Sema domain lies the cystein-rich PSI domain (plexins, semaphorins and integrins) and a domain constituted of four IPT repeats (immunoglobulin-like region found in plexins and transcription factors). The β subunit of MET also contains the transmembrane and intracellular part, with the tyrosine kinase domain and the C-terminal multidocking site. Upon HGF/SF binding, the MET receptor is dimerized and its tyrosine kinase activity is activated with autophosphorylation of the receptor, leading to recruitment of cytoplasmic transducers and induction of cellular responses (1,9).

HGF/SF and MET are commonly described as anti-apoptotic molecules since they protect many cells against cell toxicity and apoptosis caused by various stimuli, including DNA-damaging agents, serum withdrawal, and activation of death receptors (10-13). Nevertheless, some evidence also indicate that HGF/SF and MET can be pro-apoptotic. In some sarcoma and carcinoma cell lines, HGF/SF was reported to be cytotoxic and/or pro-apoptotic

(13,14). In various epithelial cell lines, as well as in primary cortical neurons, we recently reported that following stress stimuli, MET itself is cleaved by cellular caspases at aspartic acid residue D1000 within the ESVD sequence of its juxtamembrane region (15). This cleavage does not inactivate MET, rather it causes the generation of a pro-apoptotic cytoplasmic fragment of 40 kDa, called p40 MET. This fragment contains the tyrosine kinase domain and the pro-apoptotic activity of p40 MET is dependent of its kinase activity. In this work, we search for the potential endogenous counterpart of p40 MET, which could contain the whole extracellular region of MET.

Experimental procedures

Cell culture. Madin-Darby Canine kidney (MDCK) epithelial cells, 293T human embryonal kidney cells (HEK293T) and Hela human carcinoma cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL) and antibiotics. MCF-10A human normal breast cells were cultured in DMEM/F12 5% horse serum (Gibco BRL) supplemented with cholera toxin (100 ng/ml), EGF (20 ng/ml), insulin (10 ng/ml) and hydrocortisone (500 ng/ml).

Pharmacological compounds and antibodies. Human recombinant TRAIL and HGF/SF were purchased from Peprotech, MG101 and anisomycin from Calbiochem, staurosporin and camptothecin from Sigma, zVAD-fmk from Kamiya and sulfo-EGS from Pierce. The following MET primary antibodies were used : monoclonal anti-human extracellular MET (DL-21, UBI), monoclonal anti-human intracellular MET (25H2, Cell Signaling Technology), polyclonal anti-human intracellular MET (C-28, Santa Cruz) and monoclonal anti-mouse intracellular MET (B-2, Santa Cruz). Monoclonal anti-V5 epitope was purchased from Invitrogen and polyclonal anti-active (cleaved) caspase 3 (#9661) from Cell Signaling Technology. The secondary antibodies used for immunoblotting were peroxidase-conjugated anti-Rabbit IgG or peroxidase-conjugated anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) (16). The secondary antibody used for immunofluorescence was Fluorescein (FITC)-conjugated anti Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch).

Cloning of p100 MET and other plasmids. Mouse p100 MET was amplified by PCR using a mouse MET template (pMB11 mo MET), a kind gift from Dr George Vande Woude, Laboratory of Molecular Oncology, Van Andel Research Institute, Grand Rapids, MI, USA. Oligonucleotides were designed in order to add restriction sites at both ends (5' : HindIII and 3' : XhoI), and to replace aspartic acid residue D1000 by asparagine. [5' : GTGTAGCAGAAGCTTGGCATGTG, 3' : GTAGCTCTCGAGTTTACAGACTC]. The amplified PCR product was ligated into the vector PCRII TOPO using a TOPO TA Cloning kit (Invitrogen). The p100 MET insert was sequenced and digested using Hind III and Xho I for subsequent ligation in pcDNA3 V5 His B (Invitrogen). pMT2 plasmid encoding human MET and a kinase dead version were generously provided by Dr Flavio Maina, IBDM, Campus de Luminy, Marseille, France. An uncleavable version of human MET was created using a QuickChange site-directed mutagenesis system (Stratagene), with pMT2 MET as a template and the following primers : [5'CAAATGAATCTGCAGACTACCGAGCT AC3' and 5'GTAGCTCGGTAGTCTGCAG-ATTCATTTG 3']. Insertion of the mutation was verified by sequencing.

Transient transfections. Transient transfections of MDCK cells were performed using the lipofection method, as described previously (17). For transient transfection of HEK293T 300,000 cells were cultured in 6-well plates and were incubated with a mixture of DNA (1 µg/ml) and PEI/Exgen 500 (4 µl, Euromedex) for 6 h. The medium was then replaced by DMEM 10% FBS.

Crosslinking, immunoprecipitation and immunoblotting. Cells transiently transfected or not, were cultured one day in DMEM-10% FBS and then cultured in DMEM-serum free. Protein crosslinking was performed by adding sulfo-EGS (Pierce) 2 h at 4°C in ice-cold PBS and the reaction was then quenched by adding Tris 1M for 15 min. At the end of the experiment, cells were rinsed twice in cold PBS and lysed in PY lysis buffer (18), in the presence of protease inhibitors (aprotinin, leupeptin and PMSF) and phosphatase inhibitors (Na₃VO₄, β-glycerophosphate). Protein concentration of cell extracts was determined using a BioRad protein

assay. Immunoprecipitation was performed by adding appropriate antibody into cellular extracts, with overnight incubation at 4°C under gentle rotation. The day after, protein A sepharose-4B (Amersham Biosciences) was added for 1 h. After 4 washes with lysis buffer, the samples were boiled in Laemmli buffer and subjected to immunoblotting, as described previously (19).

Immunofluorescence assay. MDCK cells (100,000 cells/ 12 well plates), were cultured for one day in DMEM-10% FBS on glass cover slips and transiently transfected, as described above. At the end of the experiment, cells were rinsed in PBS, fixed with 4% paraformaldehyde (PFA), permeabilized with 0.1% Triton X-100 and blocked with 0.2% casein for 30 min. Cells were incubated 1 h with the anti-V5 antibody (1:200), washed and incubated with fluorescein-conjugated anti-mouse IgG (1:200). Coverslips were mounted with Glycergel mounting medium (Dako), and fluorescence examined using a confocal microscope (CLSM Leica SP2 AOBS).

Transactivation assay. Cells were cultured in 12 well plates at low confluence (100,000 cells for HEK293T, 25,000 cells for MDCK), transfected as described above, and transactivation assays were performed as described previously (19). Briefly, 24 h after transfection, cells were treated or not with HGF/SF in DMEM-serum free. The next day, cells were rinsed and disrupted in reporter lysis buffer (Promega) and assayed for protein content and luciferase activity. Fold activation is the ratio from each luciferase value, relative to the value from the reporter gene with control expression vector.

Results

Generation by stress of extracellular p100 MET, the counterpart of intracellular p40 MET.

In order to check the fate of the MET receptor exposed to stress conditions, human adenocarcinoma Hela cells were treated with TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), a member of the TNF superfamily that induce apoptosis through engagement of death receptors (20). Treatment with TRAIL for several hours was indeed found to induce massive cell detachment, as well as induction of active caspase 3, a marker of apoptosis (Fig. 1A, bottom panel). As expected, endogenous MET

was detected both at 170 kDa (MET precursor) and at 140 kDa (MET β -chain) using an anti-human MET antibody. Following TRAIL treatment, the p40 MET fragment was detected using an anti intracellular MET antibody, while a band of 100 kDa, p100 MET, was detected in parallel using an anti extracellular MET antibody (Fig. 1A). Both fragments disappeared when cells were treated by zVAD-fmk, a pan-caspase inhibitor, indicating that these fragments are generated by a caspase-dependent cleavage. In addition, both fragments and in particular p40 MET, were stabilized in the presence of MG101, a proteasome inhibitor, showing that these MET fragments are sensitive to proteasome degradation. Nonetheless, we cannot exclude the possibility that MG101 also contributes to the generation of these fragments, since MG101 itself can be pro-apoptotic (data not shown, (21)).

Concomitant generation of p100 MET and p40 MET was also observed using distinct stress inducers, including anisomycin, staurosporin and camptothecin (Fig. 1B). These compounds are known to induce apoptosis by distinct mechanisms, including regulation of specific kinases, inhibition of protein translation and induction of DNA damages (22-24). All these treatments induced apoptosis in Hela cells, as evidenced by detection of active caspase 3 (Fig. 1B, bottom panel). The generation of both fragments by stress was also detected in the human normal breast epithelial MCF-10A cell line (Fig. 1C), showing that this effect is not cell specific. In MDCK epithelial cells of canine origin, p40 MET is detectable, as previously reported (15), but not p100 MET (data not shown), because the anti extracellular MET antibody directed against human MET does not recognize canine MET.

These data show that stress stimuli cause the caspase-dependent generation of two fragments, p100 MET and p40 MET, from the endogenous MET receptor.

Caspase cleavage of MET occurs at aspartic acid 1000 within the juxtamembrane region

We previously demonstrated that the caspase-dependent cleavage of MET occurs at aspartic acid D1000 of the ESVD¹⁰⁰⁰ sequence of the juxtamembrane region of murine MET (15) and this sequence is conserved in human MET (ESVD¹⁰⁰²). In order to assess that p100 MET and p40 MET are produced from this caspase cleavage site, we generated a plasmid encoding full human MET mutated at the caspase cleavage

site. In MDCK epithelial cells transiently transfected by human MET, we detected both p40 MET and p100 MET, using appropriate intra- and extra- cellular human MET antibodies (Fig. 2). Although anisomycin amplified detection of these fragments (lane 3 compared to lane 1), we noticed that stress induced by transient transfection was sufficient to generate these MET fragments, while active caspase 3 was not yet detectable (lane 1). This might be explained by stress induced by transient transfection, which was sufficient to cause MET cleavage at a low level of caspase activation. Importantly, neither p40 MET nor p100 MET were generated from human MET mutated at the caspase cleavage site (lanes 5, 7), showing that both fragments result from the cleavage of MET within the ESVD¹⁰⁰² sequence. As expected, when cells were incubated with the pan-caspase inhibitor zVAD-fmk, both fragments were not detected anymore (lanes 2, 4, 6, 8), confirming the caspase-dependent cleavage of MET.

An additional band of about 125 kDa was also detected, which may correspond to the cleavage of the p170 MET precursor. Indeed, transfected full MET was detected as a precursor of 170 kDa (white arrow) and as a mature form of 140 kDa (β chain, black arrow), similarly to endogenous MET (compare fig 1 and 2). Following stress, two fragments at ~125 and ~100 kDa were also detected (lanes 1, 3), each being strongly decreased by zVAD-fmk treatment (lanes 2-4). These bands most likely correspond to the precursor form (white arrow head) and mature form of p100 MET (black arrow head), generated from full MET expression. Accordingly, this suggests that the MET 170 kDa precursor is also a caspase target. It is worth noticing, that we never detected endogenous p125 MET (Fig. 1), indicating that detection of p125 MET is favored by overexpression of transfected full MET.

These results established that p100 MET is the cellular counterpart of p40 MET, with both fragments being generated at a unique caspase cleavage site of the juxtamembrane region of the MET receptor.

p100 MET can form homodimers and p100/p140 MET heterodimers

According to the juxtamembrane cleavage caspase site, p100 MET should contain the entire extracellular part of MET, the transmembrane region and 47 amino acids of the intracellular part. To further characterize p100 MET, we

generated a plasmid encoding murine p100 MET from start codon to the caspase cleavage site fused to a C-terminal V5 His tag. To avoid the possible caspase cleavage of this construct resulting in the loss of the V5-His tag, aspartic acid residue (D¹⁰⁰⁰) was replaced by asparagine (N¹⁰⁰⁰) (Fig. 3A).

In MDCK cells transiently transfected with this construct, we verified that p100 MET was expressed at the expected sizes. In agreement with figure 2, a mature form at 100 kDa, and a precursor form at 125 kDa were detected using an anti-V5 antibody (Fig. 3B). Using confocal microscopy, we demonstrated that p100 MET is localized at the plasma membrane (Fig. 3C), as expected for a MET fragment containing the transmembrane region.

Since the extracellular part of MET is necessary for receptor dimerization (6-8,25), we checked whether p100 MET is able to homodimerize. Cells were transfected with the p100 MET expression vector and were then treated by sulfo-EGS, a cell membrane impermeable protein crosslinker. Cell lysates were analyzed by immunoblotting using an anti-V5 antibody. In addition to p100 MET, a higher molecular weight band was detected at the highest concentration of sulfo-EGS, which corresponds to p100 MET homodimers (Fig. 4A).

We further checked whether p100 MET can heterodimerize with full length MET. Cells were co-transfected with p100 MET and full length MET expression vectors and then treated by sulfo-EGS. At the end of the experiment, p100 MET was immunoprecipitated from cell lysates using an anti-V5 antibody and MET was detected by immunoblotting using an anti-intracellular MET, which only recognizes full MET (Fig. 4B). A high molecular band (arrow) was detected only when both p100 MET and full MET were co-expressed, while direct immunoblotting using the anti-V5 antibody allowed to verify expression of p100 MET. This band migrates at a higher molecular weight than the precursor form p170 MET and most likely corresponds to heterodimers between p140 MET and p100 MET. As expected, precursor forms of MET did not display cross-linking, as sulfo-EGS is cell membrane impermeable.

These results demonstrated that p100 MET is localized at the plasma membrane and can interact with itself or with full MET.

p100 MET inhibits transcriptional response induced by HGF/SF or MET signaling

In order to evaluate the ability of p100 MET to interfere with HGF/SF signaling, we performed transactivation assays, using a reporter vector in which the luciferase gene is driven by a promoter containing RAS-Responsive-Elements (RRE). This assay allows to quantify in a sensitive manner a transcriptional response to HGF/SF (17,19). MDCK epithelial cells were co-transfected with p100 MET and the RRE-luc reporter vector, and were treated by HGF/SF for 24 h. The dose-dependent increase of the transcriptional response by HGF/SF was found to be impaired by expression of p100 MET (Fig. 5A). These results show that the signaling pathways activated by HGF/SF and leading to RAS-dependent transcriptional response are inhibited by enforced expression of p100 MET.

To specifically evaluate the ability of p100 MET to inhibit MET signaling, we took advantage of HEK293T cells, which respond to enforced MET expression and are weakly sensitive to HGF/SF stimulation acting through endogenous MET (data not shown). We co-transfected expression vectors of MET or MET Kinase Dead (MET KD) with p100 MET. Transfected MET induce a strong transcriptional response, which was inhibited in a dose-dependent manner by co-transfection of p100 MET (Fig. 5B). As a control, we verified that MET KD was unable to induce a transcriptional response and that this response was not modified by p100 MET. This result shows that p100 MET can act in a dominant negative fashion on a transcriptional response induced by the MET receptor.

Taken together, we demonstrated that p100 MET is a natural dual-function decoy MET receptor, capable to interfere both with HGF/SF-induced and ligand-independent MET signaling.

Discussion

While activation of the MET tyrosine kinase receptor by HGF/SF is known to favor cell survival against various stress stimuli, we recently evidenced that stress stimuli cause the caspase-dependent cleavage of MET (15). This cleavage confers original pro-apoptotic properties to the MET receptor through the generation of an intracellular pro-apoptotic p40 MET fragment. Here, we demonstrated that this caspase-dependent cleavage splits the MET

receptor at the ESVD sequence of the juxtamembrane region, generating the intracellular p40 MET fragment and an additional membrane bound p100 MET fragment, which functions as a natural MET decoy.

Following treatment of cells with distinct stress stimuli, we evidenced the generation of p100 and p40 MET fragments, either from endogenous or transfected MET. In addition, generation of these fragments was impaired from a MET receptor mutated at the ESVD sequence. These data demonstrated that both p100 MET and p40 MET are generated at a single caspase cleavage site of the juxtamembrane region. This caspase-dependent cleavage is distinct to another proteolytic cleavage of MET previously identified, which generate a soluble extracellular MET fragment of 80-85 kDa and a 55 kDa intracellular counterpart (26,27). Although the cleavage site was not identified, the soluble extracellular fragments is most likely generated by ectodomain shedding (28).

The identified p100 MET fragment is membrane bound, contains the entire extracellular part of p140 MET and is devoid of the kinase domain. In particular, it contains the Sema domain which is necessary for HGF/SF binding and receptor dimerization (6-8,25). This fragment was therefore predicted to act as a dual function decoy receptor, both by preventing HGF/SF binding to MET and by acting in a dominant negative fashion on MET signaling. Accordingly, we demonstrated that p100 MET was able to prevent either HGF/SF or MET signaling leading to a RAS-dependent transcriptional response. Our findings are in agreement with recent descriptions of artificial decoy receptors of MET (8,25). In particular, a transmembrane decoy MET construct, corresponding to the natural occurring p100 MET with only 4 amino acids remaining in the cytoplasm, was found to form homodimers and to interact with HGF/SF (8). Similarly, an artificial soluble extracellular domain of MET was found to function as a decoy receptor, being able to decrease both ligand dependent- an independent- mechanisms (25).

Generation of p100 MET and p40 MET by caspase cleavage in response to stress is associated with disappearance of full MET. This observation may have direct consequences on the balance between cell survival and cell death involving the HGF/SF-MET signaling system. Indeed, ligand-activated MET can induce

survival pathways to oppose stress signaling leading to apoptosis. Nonetheless, stress can also lead to the cleavage of MET and we demonstrated that disappearance of MET is associated with the generation of p100 MET and p40 MET fragments. Since the p100 MET fragment functions as a decoy receptor, it should prevent HGF/SF-MET survival activity, while the p40 MET fragment becomes ligand independent and acquires proapoptotic activity (15). This cleavage therefore inactivates the survival function of MET and generates two fragments which can favor apoptosis.

Within the family of tyrosine kinase receptors, natural membrane bound decoy receptors have been poorly described. FGFR1 (Fibroblast growth factor receptor-like 1) is a transmembrane receptor which can interact with FGF2 but lacks an intracellular kinase domain (29). This natural decoy receptor for FGF ligands is encoded by a specific gene within the FGFR family. Alternative splicing forms of TRKB lacking an intracellular kinase domain have been reported, which correspond to potential membrane bound decoy receptors (30). This contrasts with other potential natural decoy receptors, which are rather issued from proteolytic cleavages of the corresponding receptor. This includes ectodomain shedding by metalloproteases generating soluble extracellular receptors and intracellular cleavages by caspases generating membrane bound extracellular receptors. In addition to MET, other tyrosine kinase receptors are cleaved by caspases within their intracellular parts, i.e. ErbB1 (31), ErbB2 (32,33) and RET (34). ErbB1 and ErbB2 are cleaved within their C-terminal regions and a decoy function of their truncated versions was not reported. It was rather proposed that the caspase cleavage abrogates the C-terminal recruitment of signaling molecules, such as PLC- γ , capable to mediate survival pathways (31). RET is cleaved within its juxtamembrane region and the intracellular part of RET is proapoptotic when overexpressed in cells (34). Although in cells exposed to stress conditions, the fate of RET and MET is very similar, the existence and function of the resulting extracellular part of RET have not been reported.

The use of tyrosine kinase decoy receptors to inhibit tumor progression is being explored as a promising therapeutic strategy. This includes the MET receptor (8,25), as well as other receptors, including VEGFR (35) and RET (36). The expression of a MET soluble decoy in mice

was found to inhibit experimental tumor growth and to prevent the formation of spontaneous metastases (25). Similarly, a VEGFR-3 (Vascular endothelial growth factor receptor) soluble decoy was found to potently inhibit the development of lymph node metastasis in three distinct metastatic tumor models in mice (35). Their efficiency has been linked to their decoy function, which impairs normal ligand-receptor signaling. Our data open the possibility that in addition to inhibit invasive growth and survival contributing to tumor progression, some decoy receptors may also play an active role in promoting apoptosis.

Acknowledgements

This work was supported by CNRS, Pasteur Institute of Lille, USTL (Université des Sciences et Technologies de Lille) and INSERM, and by grants from Fondation de France, Ligue Régionale contre le Cancer- Comité Nord and Région Nord-Pas de Calais - FEDER. JD wants to thank ARERS (Association Régionale pour l'Enseignement et la Recherche Scientifique) and ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer) for their research fellowships.

References

1. Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., and Vande Woude, G. F. (2003) *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 915-925
2. Jiang, W. G., Martin, T. A., Parr, C., Davies, G., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (2005) *Crit Rev Oncol Hematol* **53**, 35-69
3. Schmidt, L., Duh, F. M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S. W., Zhuang, Z., Lubensky, I., Dean, M., Allikmets, R., Chidambaram, A., Bergerheim, U. R., Feltis, J. T., Casadevall, C., Zamarron, A., Bernues, M., Richard, S., Lips, C. J., Walther, M. M., Tsui, L. C., Geil, L., Orcutt, M. L., Stackhouse, T., Zbar, B., and et al. (1997) *Nat Genet* **16**, 68-73.
4. Lorenzato, A., Olivero, M., Patane, S., Rosso, E., Oliaro, A., Comoglio, P. M., and Di Renzo, M. F. (2002) *Cancer Res* **62**, 7025-7030
5. Trusolino, L., and Comoglio, P. M. (2002) *Nat Rev Cancer* **2**, 289-300
6. Stamos, J., Lazarus, R. A., Yao, X., Kirchhofer, D., and Wiesmann, C. (2004) *Embo J* **23**, 2325-2335

7. Gherardi, E., Youles, M. E., Miguel, R. N., Blundell, T. L., Iamele, L., Gough, J., Bandyopadhyay, A., Hartmann, G., and Butler, P. J. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12039-12044
8. Kong-Beltran, M., Stamos, J., and Wickramasinghe, D. (2004) *Cancer Cell* **6**, 75-84
9. Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G., and Comoglio, P. M. (1994) *Cell* **77**, 261-271.
10. Xiao, G. H., Jeffers, M., Bellacosa, A., Mitsuchi, Y., Vande Woude, G. F., and Testa, J. R. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 247-252.
11. Kosai, K., Matsumoto, K., Nagata, S., Tsujimoto, Y., and Nakamura, T. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **244**, 683-690
12. Bowers, D. C., Fan, S., Walter, K. A., Abounader, R., Williams, J. A., Rosen, E. M., and Latterra, J. (2000) *Cancer Res* **60**, 4277-4283.
13. Arakaki, N., Kazi, J. A., Kazihara, T., Ohnishi, T., and Daikuhara, Y. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **245**, 211-215
14. Tajima, H., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (1991) *FEBS Lett* **291**, 229-232
15. Tulasne, D., Deheuninck, J., Lourenco, F. C., Lamballe, F., Ji, Z., Leroy, C., Puchois, E., Moumen, A., Maina, F., Mehlen, P., and Fafeur, V. (2004) *Mol Cell Biol* **24**, 10328-10339
16. Perc, G. (1974) *J Irreprod Res* **1**, 1936-1982
17. Tulasne, D., Paumelle, R., Weidner, K. M., Vandenbunder, B., and Fafeur, V. (1999) *Mol Biol Cell* **10**, 551-565
18. Pelicci, G., Giordano, S., Zhen, Z., Salcini, A. E., Lanfrancone, L., Bardelli, A., Panayotou, G., Waterfield, M. D., Ponzetto, C., Pelicci, P. G., and et al. (1995) *Oncogene* **10**, 1631-1638
19. Paumelle, R., Tulasne, D., Kherrouche, Z., Plaza, S., Leroy, C., Reveneau, S., Vandenbunder, B., and Fafeur, V. (2002) *Oncogene* **21**, 2309-2319
20. Almasan, A., and Ashkenazi, A. (2003) *Cytokine Growth Factor Rev* **14**, 337-348
21. An, W. G., Hwang, S. G., Trepel, J. B., and Blagosklonny, M. V. (2000) *Leukemia* **14**, 1276-1283
22. Torocsik, B., and Szeberenyi, J. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **278**, 550-556
23. Xue, L. Y., Chiu, S. M., and Oleinick, N. L. (2003) *Exp Cell Res* **283**, 135-145
24. Liu, L. F., Desai, S. D., Li, T. K., Mao, Y., Sun, M., and Sim, S. P. (2000) *Ann N Y Acad Sci* **922**, 1-10
25. Michieli, P., Mazzone, M., Basilico, C., Cavassa, S., Sottile, A., Naldini, L., and Comoglio, P. M. (2004) *Cancer Cell* **6**, 61-73
26. Galvani, A. P., Cristiani, C., Carpinelli, P., Landonio, A., and Bertolero, F. (1995) *Biochem Pharmacol* **50**, 959-966
27. Jeffers, M., Taylor, G. A., Weidner, K. M., Omura, S., and Vande Woude, G. F. (1997) *Mol Cell Biol* **17**, 799-808
28. Wajih, N., Walter, J., and Sane, D. C. (2002) *Circ Res* **90**, 46-52
29. Trueb, B., Zhuang, L., Taeschler, S., and Wiedemann, M. (2003) *J Biol Chem* **278**, 33857-33865
30. Kryl, D., and Barker, P. A. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 925-930
31. Bae, S. S., Choi, J. H., Oh, Y. S., Perry, D. K., Ryu, S. H., and Suh, P. G. (2001) *FEBS Lett* **491**, 16-20
32. Benoit, V., Chariot, A., Delacroix, L., Deregowski, V., Jacobs, N., Merville, M. P., and Bours, V. (2004) *Cancer Res* **64**, 2684-2691
33. Tikhomirov, O., and Carpenter, G. (2001) *J Biol Chem* **276**, 33675-33680
34. Bordeaux, M. C., Forcet, C., Granger, L., Corset, V., Bidaud, C., Billaud, M., Bredesen, D. E., Edery, P., and Mehlen, P. (2000) *Embo J* **19**, 4056-4063
35. Lin, J., Lalani, A. S., Harding, T. C., Gonzalez, M., Wu, W. W., Luan, B., Tu, G. H., Koprivnikar, K., VanRoey, M. J., He, Y., Alitalo, K., and Jooss, K. (2005) *Cancer Res* **65**, 6901-6909
36. Cerchia, L., Libri, D., Carlomagno, M. S., and de Franciscis, V. (2003) *Biochem J* **372**, 897-903

Figure legends

Fig. 1 The MET tyrosine kinase receptor is split by a caspase-dependent cleavage. (A) HeLa cells were treated by TRAIL (10 ng/ml) for the indicated times with or without proteasome inhibitor MG101 (50 μ M) or the pan-caspase inhibitor zVAD-fmk (20 μ M). Protein lysates were immunoblotted with anti human MET antibodies, recognizing either the extracellular part (α extra-Met, DL-21) (top) or the intracellular part (α intra-Met, 25H2) (middle). Membranes were stripped and reprobed using an anti-active caspase 3 antibody (bottom). The arrowheads indicate the positions of the p170 MET precursor, p140 MET β subunit and of the p100 and p40 MET fragments. (B) HeLa cells were treated with apoptotic inducers : anisomycin (Ani, 50 μ M), TRAIL (10 ng/ml), staurosporin (Stau, 100 nM) and camptothecin (Campto, 5 μ M) for 8 h. Protein lysates were immunoblotted with the anti-MET antibodies and reprobed with the anti-active caspase 3 antibody, as described in A. (C) Human MCF-10A and HeLa cells were treated by anisomycin (50 μ M) for 8 h in the presence of MG101 (50 μ M). Protein lysates were immunoblotted with the anti-MET antibodies and reprobed with the anti-active caspase 3 antibody, as described in A.

Fig. 2. Caspase cleavage occurs within the ESVD sequence. MDCK cells were transfected by a pMT2 plasmid encoding full length human MET, either wild type (WT) or uncleavable (uncleav., mutated at the caspase cleavage site). The day after transfection, anisomycin (50 μ M) and/or zVAD-fmk (20 μ M) was added for 8 h. Cells were then lysed and protein lysates were subjected to immunoblotting using specific anti-MET antibodies (DL-21, 25H2), and the membranes were reprobed using the anti-active caspase 3 antibody. The arrows indicate the positions of the p170 MET precursor (white arrow), p140 MET β subunit (black arrow), and of the p125 (white arrowhead), p100 and p40 MET fragments (black arrowheads). The p125 fragment most likely corresponds to a cleaved form of the p170 MET precursor.

Fig. 3. Ectopic expression of p100 MET. (A) Schematic representation of the murine p100 MET construct, corresponding to the extracellular part of MET, including Sema, PSI and IPT domains, anchored at the plasma membrane and containing 47 amino acids of the intracellular part. Aspartic acid 1000 was replaced by asparagine to prevent potential caspase cleavage of the V5 tag. (B) MDCK cells were transiently transfected with plasmids expressing murine MET (p140 MET) or p100 MET (p100 MET). Cell lysates were subjected to immunoblotting using an anti-intracellular MET antibody (B-2) or the V5 antibody. White arrows correspond to the precursor forms of full length MET (p170) or of p100 MET (p125), and black arrows correspond to p140 MET β subunit and p100 MET fragment. (C) MDCK cells were transiently transfected with plasmid expressing p100 MET. The following day, immunofluorescence was performed using an anti-V5 antibody.

Fig. 4. p100 MET can homodimerize and interact with full length Met. (A) HEK293T cells were transiently transfected with the plasmid encoding p100 MET and treated the following day by sulfo-EGS for 2 h at the indicated concentrations. Protein lysates were immunoblotted using an anti-V5 antibody. (B) HEK293T cells were co-transfected with p100 MET and full length MET. The day after transfection, cells were treated with 1 mM sulfo-EGS for 2 h and protein lysates were subjected to immunoprecipitation using an anti-V5 antibody. Whole cell lysate (WCL) or immunoprecipitated samples were immunoblotted using anti-intracellular MET antibody (C-28). The membrane was then stripped and reprobed using an anti-V5 antibody.

Fig. 5. p100 MET prevents transcriptional responses induced by p140 MET or HGF/SF. (A) MDCK cells were co-transfected with plasmids encoding p100 MET or the empty vector with the reporter vector RRE-luc. Following transfection, cells were serum starved and treated for 24 h with HGF/SF at the indicated concentrations. Luciferase activity was quantified 48 h later ($n=3 \pm$ SD). (B) HEK293T cells were co-transfected with plasmids encoding full length MET WT or kinase dead (KD) and increasing amount of p100 MET (ratio p100 MET/MET : 0/1 – 0.5/1 – 1/1) and the RRE-luc reporter vector. Luciferase activity was quantified 48 h later ($n=3 \pm$ SD).

Fig. 1

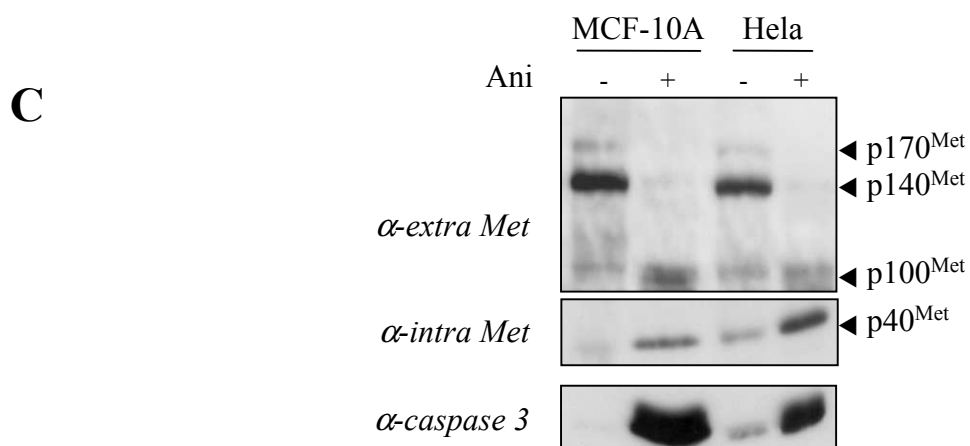
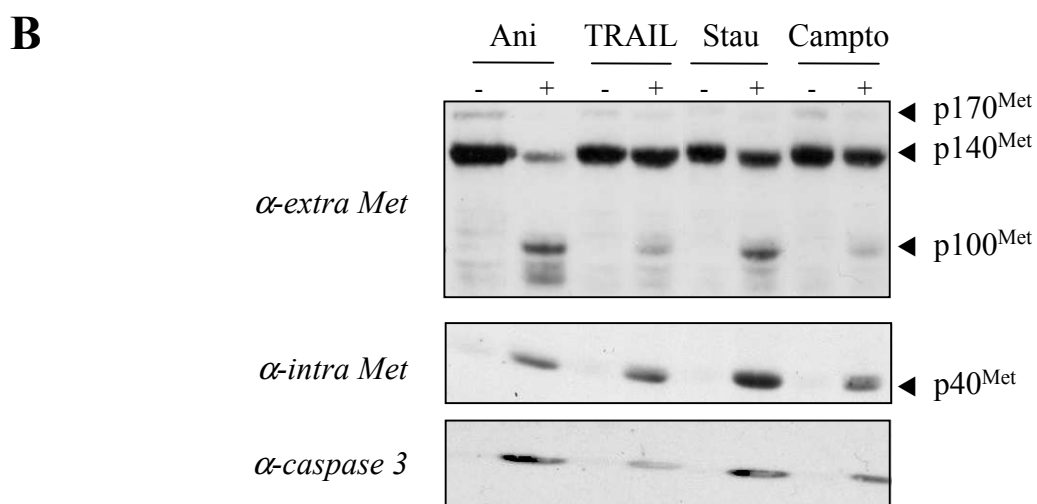
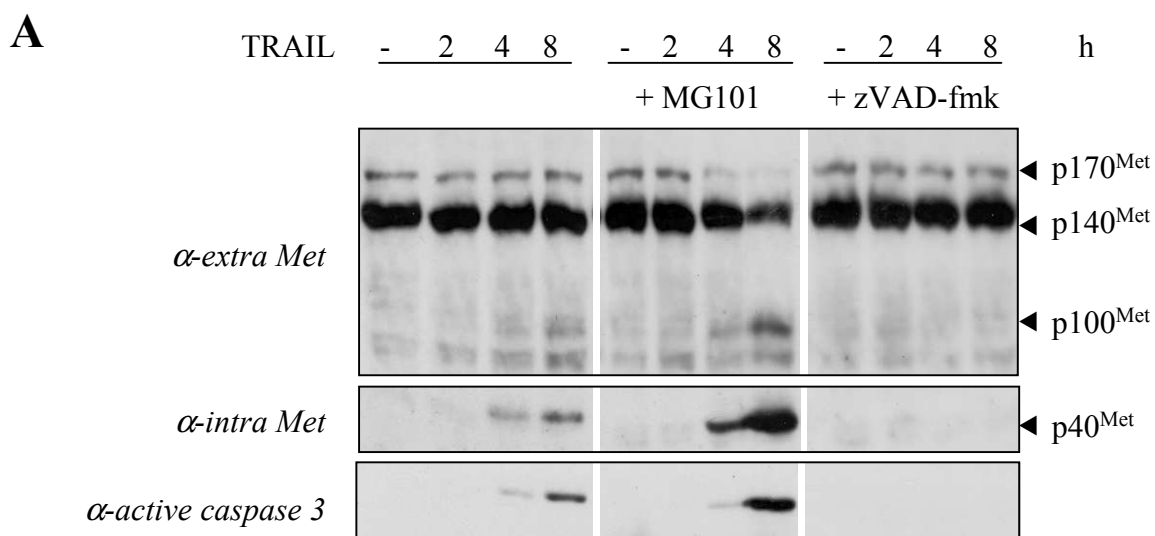


Fig. 2

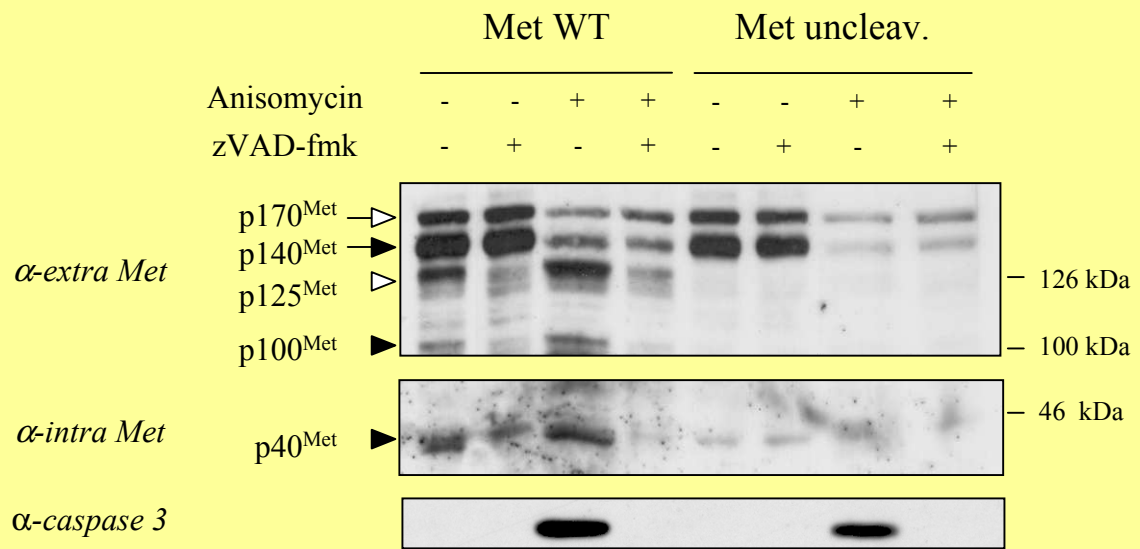


Fig. 3

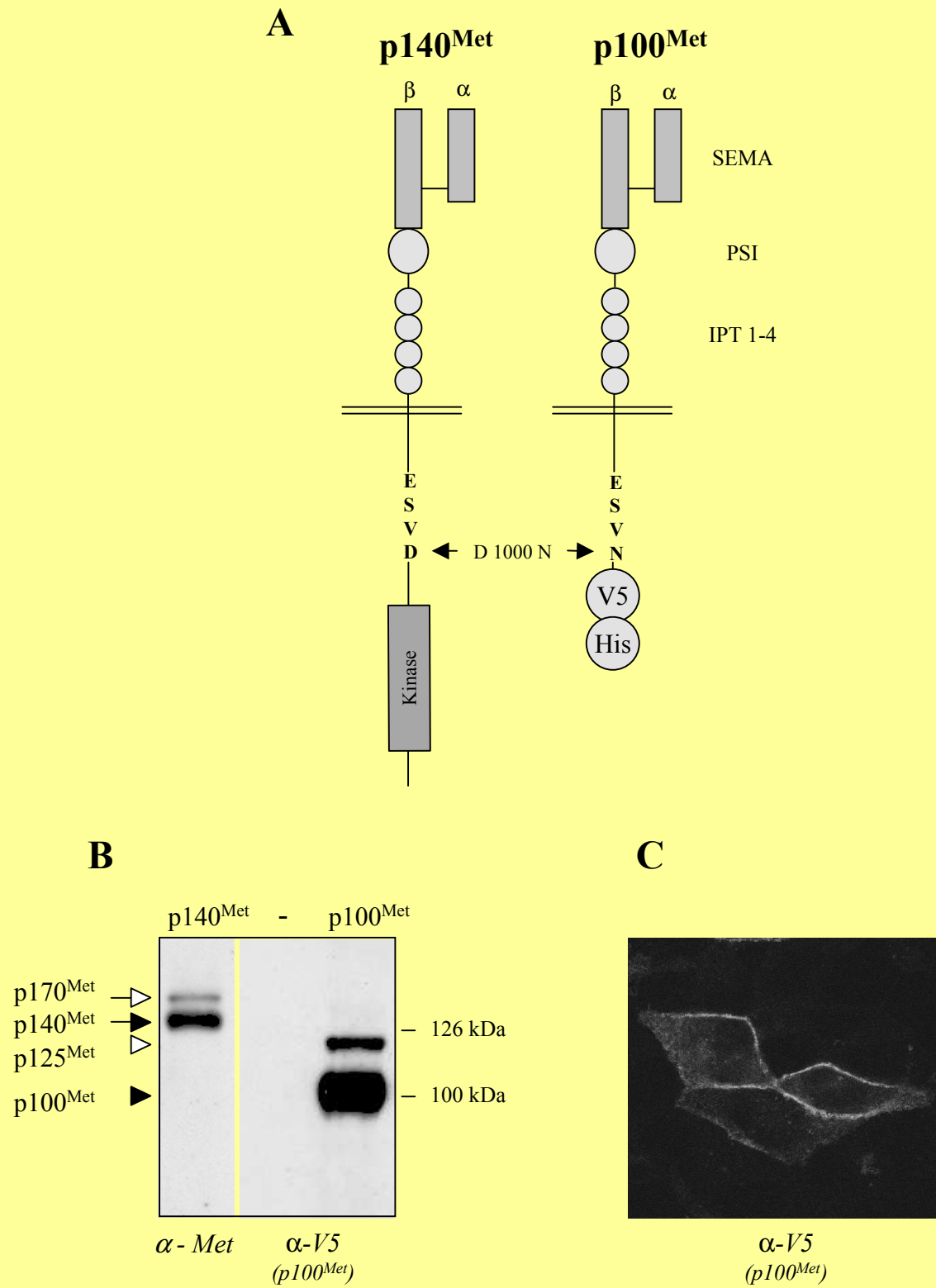
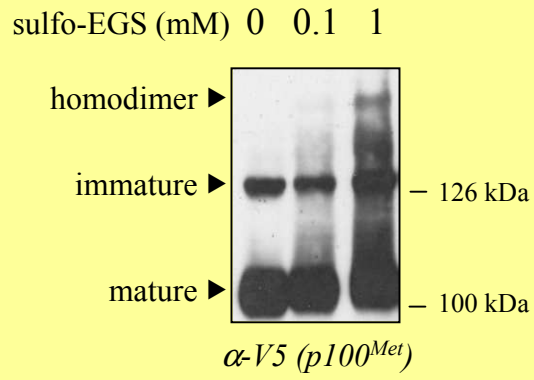


Fig. 4

A



B

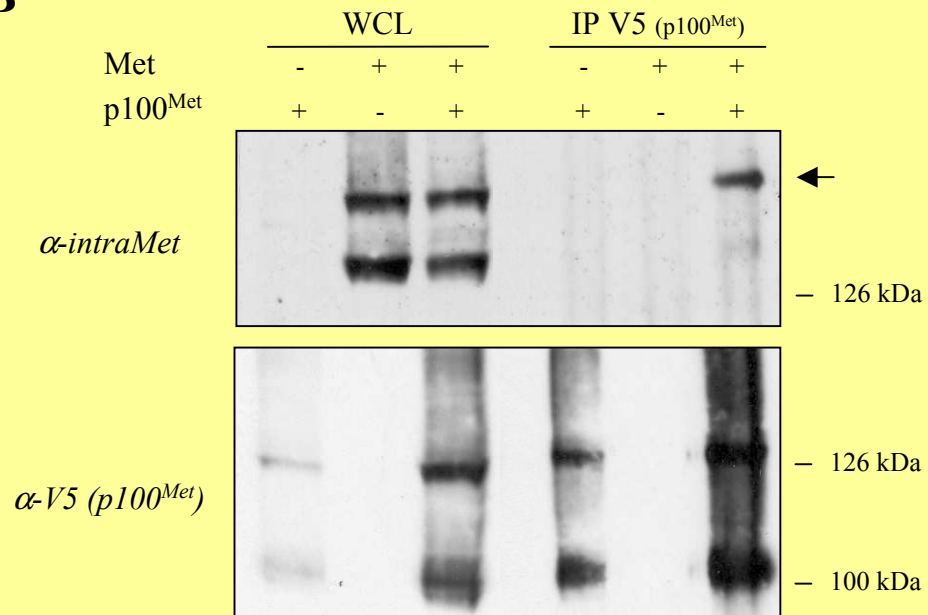
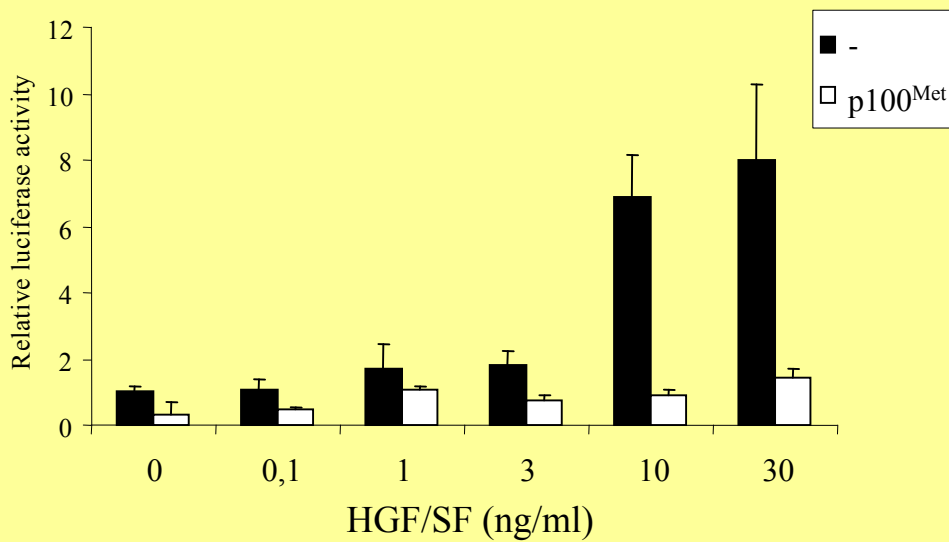
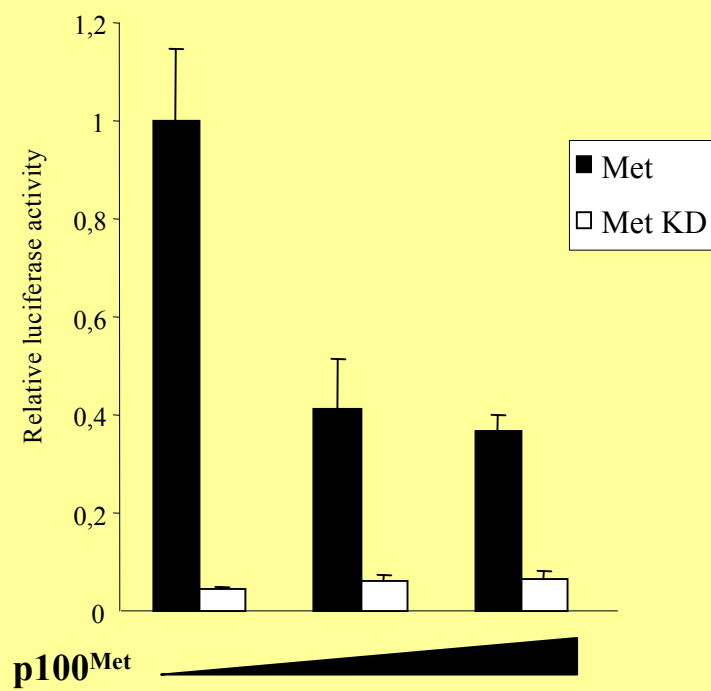


Fig. 5

A



B



2. Conclusion

Nous avons donc montré que le récepteur MET, après son clivage par les caspases dans la région juxtamembranaire, génère concomitamment deux fragments inégaux, l'un intra-cellulaire d'environ 40 kDa, et l'autre transmembranaire d'environ 100 kDa. Ce dernier, localisé à la membrane, possède toutes les qualités requises pour devenir un récepteur-leurre pour le ligand, l'HGF/SF. Nous avons donc cherché à démontrer le potentiel de leurre de ce fragment.

Ces travaux ont déjà été soumis une fois à J. Biol Chem. en janvier 2006. Le refus de l'éditeur a été motivé essentiellement par une démonstration trop faible de l'effet leurre du fragment p100 MET. En particulier, il a estimé que les conclusions de ce travail n'étaient pas suffisamment soutenues par les résultats présentés.

Il faut donc convaincre les lecteurs que p100 MET est bien un leurre à l'HGF/SF généré naturellement au cours du processus d'apoptose. Pour démontrer cela, j'ai établi des clones stables de cellules MDCK exprimant le fragment p100 MET, afin de montrer l'inhibition de la signalisation de l'HGF/SF par ce fragment. Le résultat est que les cellules MDCK exprimant stablement la construction p100 MET ne se comportent pas différemment des cellules normales. L'ajout d'HGF/SF sur ces cellules induit leur dispersion et leur morphogénèse, de même que les cibles moléculaires de la signalisation (phospho-MET ou phospho-ERK) sont activées de la même manière que des cellules normales. Bien que non satisfaisant, il faut essayer de comprendre ce résultat. Tout d'abord, il faut remarquer que dans la littérature, les inhibiteurs de signalisation utilisant la région extracellulaire de MET que les auteurs décrivent comme prometteur d'un point de vue thérapeutique sont exclusivement des fragments libres dans le milieu (Kong-Beltran et al., 2004; Michieli et al., 2004). En particulier, Kong-Beltran et al. commencent par étudier des fragments extra-cellulaires de MET toujours liés à la membrane, et montre leurs capacités de dimérisation et d'interaction avec l'HGF/SF, alors que pour les tests d'inhibition de la signalisation, ils utilisent une protéine recombinante correspondant au domaine SEMA de MET, libre dans le milieu... Ce fragment non ancré à la membrane, n'est donc pas nécessairement synthétisé par les cellules, et leur permet d'en ajouter des quantités pharaoniques. Il semblerait donc que pour obtenir des effets d'inhibition, il faille une grande quantité de récepteur-leurre.

Ceci ne signifie pas que la p100 MET naturelle n'a pas de fonction potentielle de récepteur-leurre, en effet, sous l'influence d'un stress pro-apoptotique, p100 MET apparaît

quand MET disparaît... Ce qui signifie qu'une balance s'établit entre les 2 molécules, qui est plus favorable à p100 MET quand l'apoptose progresse. Or, la transfection stable ne permet pas de mimer ce mécanisme, puisque ces cellules gardent une proportion importante de récepteur MET fonctionnels. On pourrait donc penser que c'est la conjonction des deux phénomènes, l'apparition de p100 MET couplée à la disparition de MET qui est importante pour sa fonction. Il faudra donc réussir à mimer ce phénomène artificiellement pour en évaluer l'importance.

Enfin, d'autres hypothèses peuvent être émises : En premier lieu, on peut critiquer le fragment artificiel de p100 MET que j'ai créé : il a été construit à partir d'un MET murin, alors que les tests d'inhibition sont réalisés sur des cellules d'origine canine ou humaine, ou contre un MET de pleine longueur humaine. Ces contraintes d'espèce peuvent gêner l'efficacité de ce fragment artificiel. Pour éviter cela, la construction d'un fragment de p100 MET humain est en cours.

Egalement, on peut imaginer que l'étiquette C-terminale empêche l'inhibition de l'hétérodimère p100 MET – MET, ou qu'une extrémité D sortante au niveau C-terminale (résultante du clivage par les caspases de MET) pourrait être importante. C'est pourquoi le fragment p100 MET en cours de construction ne comportera pas d'étiquette C-terminale.

J'ai quand même pu montrer que p100 MET était capable d'interagir avec le récepteur MET entier, et aussi avec l'HGF/SF, ce qui apporte un argument supplémentaire pour sa fonction éventuelle de récepteur-leurre, et qui sera ajouté à la prochaine version de la publication.

Pour conclure, je dirais que ce travail dont le résultat paraissait évident au départ, m'a donné beaucoup de difficulté. Néanmoins, un travail non publié étant un travail perdu, je vais tout faire pour arriver à mes fins, et le soumettre à nouveau. Pour cela, j'espère que la nouvelle construction de p100 MET humaine va me permettre de démontrer ses capacités de leurre à HGF/SF.

III. Article 3:

Caspase cleavage of MET is prevented by autophosphorylation within its juxtamembrane region

Julien Deheuninck, Zongling Ji, Catherine Leroy, Bénédicte Foveau, Vincent Villeret, David Tulasne et Véronique Fafeur.

1. Introduction

Au vu des tailles apparentes des fragments obtenus après clivage caspase-dépendant du récepteur MET, celui-ci devait avoir lieu dans la région juxtamembranaire du récepteur. Cette région possède 9 acides aspartiques dans sa séquence, mais aucun site consensuel de clivage par les caspases (DxxD). Un site cependant s'en rapprochait et d'autres protéines avaient été décrites pour être coupées par les caspases sur des séquences approchantes (SVD). Ainsi, nous avons muté cet acide aspartique en asparagine, et vérifier que le clivage était bien perdu, démontrant que le récepteur MET était clivé par les caspases juste après l'acide aminé D1000. Par ailleurs, la mutation de ce résidu avait déjà été décrite comme une mutation gain-de-fonction pour MET. Cette fonction a été expliquée par la proximité de ce résidu D1000 avec une tyrosine phosphorylable par autophosphorylation du récepteur, la tyrosine Y2. Il a été montré que la Y2 était nécessaire à la fixation du domaine TKB de CBL, conduisant à l'ubiquitinylation, le trafic et la dégradation du récepteur activé. De plus, une mutation Y2F, abolissant le recrutement de CBL, conférait à MET un effet transformant. Une étude a montré que les 2 résidus entourant la Y2 étaient également nécessaire à la fixation de CBL dans cette région et que leurs mutations induisait un effet transformant au récepteur MET.

Or, nous avons la volonté de démontrer que la génération d'un fragment p40 MET au cours de l'apoptose permet d'amplifier ce processus. Pour démontrer cela, il faut comparer un récepteur clivable à un récepteur non clivable. Or, le seul mutant que nous possédons qui empêche la génération de p40 MET, le mutant D1000N, est en outre, un mutant gain-de-fonction. Pour réaliser cette démonstration, nous avons essayé de séparer les deux sites, soit trouver un MET incapable d'être clivé par les caspases mais se comportant comme un récepteur sauvage, et c'est ce que j'ai réalisé dans ces travaux. Cette étude m'a également permis de mettre à jour une relation entre les deux sites, régulés par l'activation du récepteur.

Caspase cleavage of MET receptor is prevented by autophosphorylation within its juxtamembrane region

Julien DEHEUNINCK, Zongling JI, Catherine LEROY, Bénédicte FOVEAU, Vincent VILLERET, David TULASNE and Véronique FAFEUR.

Corresponding authors : Véronique FAFEUR, CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr Calmette, 59000 LILLE, France. Phone : 33- 320 87 10 91. Fax : 33- 320 87 11 11. E-mail : veronique.fafeur@ibl.fr or David Tulasne, CNRS UMR 8161. E-mail : david.tulasne@ibl.fr

Running title : Caspase cleavage prevention by MET phosphorylation

Character count : 27674/25000

Subject category : Signal transduction / Differentiation and Death

ABSTRACT

MET receptor tyrosine kinase is autophosphorylated after HGF/SF treatment. MET is also a substrate of caspase cleavage within apoptosis. We established that two sites overlap within the negatively regulating juxtamembrane region, namely the caspase cleavage site and the interaction motif for CBL. We then demonstrate that these two sites are distinguishable using specific mutations, and that a functional relationship exists. When MET is phosphorylated on Y2 by autophosphorylation, the receptor became insensitive to caspase cleavage while can interact with CBL. When non phosphorylated, the receptor could be cleaved by caspase and generate a pro-apoptotic p40 MET fragment. Taken together, we demonstrated a functional overlapping between two sites, mediated by the activation status of the receptor.

INTRODUCTION

The tyrosine kinase receptor MET is the high affinity receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF). Signaling via this receptor-ligand pair induces numerous biological activities, such as proliferation, survival, scattering or morphogenesis (Birchmeier et al., 2003). Aberrant MET and HGF/SF signaling has been involved in tumorigenesis and metastasis, through MET and/or HGF/SF overexpression (Birchmeier et al., 2003; Zhang and Vande Woude, 2003), or by activating mutations of the receptor sequence in sporadic and hereditary forms of cancer (Jeffers et al., 1997). Activation of MET occurs through dimerization upon binding of HGF to its extracellular region (Kong-Beltran et al., 2004), followed by autophosphorylation of the highly conserved residues Y8 and Y9 in the kinase domain. (N.B. : Intracellular region of MET contains 16 tyrosines, numbered from 1 (juxtamembrane) to 16 (C-terminal)). Kinase activation by autophosphorylation leads to the subsequent phosphorylation of Y2 in the juxtamembrane region and Y14 and Y15 in the C-terminal multifunctional docking site, resulting in the activation of MET signaling (Ponzetto et al., 1994), through the recruitment of a variety of SH2-containing signal transducers and effectors.

MET juxtamembrane region is an important regulatory region which negatively regulate the receptor (Vigna et al., 1999). In particular, MET activation induce Y2 phosphorylation which is recognized by the tyrosine kinase binding (TKB) domain of the E3 ubiquitin ligase CBL. This recruitment leads to ubiquitination of the receptor (Taher et al., 2002), which promotes activated MET internalization into endosomes followed by recycling or degradation by the lysosomal pathway (Carter et al., 2004; Hammond et al., 2003). MET Y2F mutation have been described as a gain-of-function mutation, as it induced a constitutive fibroblastoid phenotype in MDCK epithelial cell lines (Weidner et al., 1995). Moreover, this mutant induced morphological transformation of fibroblasts and constitutive scattering of epithelial cells (Peschard et al., 2001). These transforming properties are a likely consequence of impaired downregulation of the activated receptor by loss of CBL interaction.

We evidenced another regulation mechanism occurring within this region. Stress stimuli were found to induce MET cleavage by caspase (Tulasne et al., 2004). We identified aspartic acid D1000 as the cleavable amino acid in the MET sequence, since a D1000N mutation abrogated caspase-dependent cleavage of MET. Furthermore, we provided evidence that MET cleavage by caspase-3 in the juxtamembrane region produce a cytoplasmic fragment, called p40 MET, able itself to induce apoptosis when expressed in cells (Tulasne et al., 2004).

In this work, we investigated the connection between the caspase cleavage and the CBL interaction site within MET juxtamembrane region and revealed a highly conserved functional link between those sites.

RESULTS & DISCUSSION

Caspase cleavage site and CBL interaction motif in MET overlap.

We first established that the caspase cleavage site of MET at aspartic acid D1000 is adjacent to the phosphorylatable tyrosine Y2, crucial for MET interaction with CBL, leading to MET traffic and downregulation. We therefore speculate that such closeness could be important and tried to determine a potential relationship between them. First, it has been established that a mutation of the D1000 residue is a gain-of-function mutation, with the same characteristics as a Y2F mutation. It was demonstrated that TKB domain of CBL interact with a DpYR motif, and MET D1000 mutant is impaired in CBL binding and acquired transforming properties (Peschard et al., 2004; Weidner et al., 1995). Moreover, we evidenced that the D1000 residue is also essential for caspase cleavage of MET (Tulasne et al., 2004) as its mutation totally abrogate p40 MET generation. Taken together, the D1000 residue belongs to the caspase cleavage site and CBL interaction motif since a single mutation impaired both of them (Fig. 1), meaning that the two sites are not only adjacent but are overlapping within MET juxtamembrane domain, within a sequence highly conserved among evolution (Fig. 1 bottom).

The residues V999 and D1000 are crucial for caspase cleavage of MET.

Caspase-targeted sequence are determined by a tetrapeptide which recognition is highly dependent on the primary amino acids sequence preceding the essential aspartate residue (Talanian et al., 1997) which is ESVD in MET sequence (Fig. 1). We realized MET mutations E997A, S998A, V999A, D1000N and Y2F in TRK-MET chimera, known to mediate MET-specific signaling in response to NGF (Tulasne et al., 1999; Weidner et al., 1995). Cellular extracts of transfected MDCK were incubated with purified active caspase-3, and we analyzed p40 MET generation as an evidence of caspase-dependent cleavage of MET. We detected the fragment from MET E997A, S998A, Y2F and WT, but not from V999A and D1000N mutants (Fig. 2A). Stable MDCK cell lines expressing the different mutants were performed and treated with an apoptotic inducer (anisomycin) (Fig. 2B). We observed that both the D1000N and V999A mutation abrogated MET cleavage, in contrast to the WT and Y2F mutant, which allow p40 MET generation, and E997A and S998A mutants partially inhibited p40 MET generation. Taken together, we could determine the relative importance of

each residue within the caspase cleavage site of MET. The optimal target tetrapeptide cleavage sequence of caspase-3 is DxxD while within MET juxtamembrane region, the sequence targeted by caspase is a non-canonical ESVD. We determined that V999, like D1000, is essential for caspase cleavage of MET, while E997 and S998 are not crucial.

MET V999A mutation is not a gain-of-function mutation.

We investigated the different TRK-MET mutants for their ability to bind CBL TKB domain, by co-immunoprecipitation. We evidenced that TRK-MET WT interact with the TKB domain of CBL, while Y2F and D1000N mutants were strongly impaired in CBL interaction. Mutations E997A, S998A and in particular V999A displayed correct interaction with the TKB domain of CBL (Fig. 3A).

As a loss of CBL recruitment in the juxtamembrane region have been associated to transforming properties of MET mutants, we checked the biological properties of MDCK cell lines stably expressing the different MET mutants and we observed that D1000N or Y2F mutations induced constitutive scattering of cells, while TRK-MET WT and the other mutants E997A, S998A and V999A displayed normal islets organization (Fig. 3B) and scattered in response to NGF or HGF/SF (data not shown).

Therefore, after establishing that D1000N mutation has a dual-effect by abrogating both caspase cleavage and impairing CBL interaction with MET receptor, we demonstrated that specific mutations could selectively abrogate each site. First, the Y2F mutant impairs only CBL interaction and second, the V999A mutant impairs selectively caspase cleavage of MET. Taken together, we demonstrated that the two sites overlap but are still distinguishable by specific mutations (Fig. 3C).

Phosphorylation of Y2 inhibits caspase cleavage.

We observed by transient transfection of TRK-MET mutants in MDCK, that Y2F mutant induced high level of p40MET generation, by comparing to WT (Fig. 4). Transient transfection induced high expression level of proteins and subsequent auto-activation of MET receptor, as verified by autophosphorylation on tyrosine residue, and also induced cellular stress sufficiently to induce small amount of caspase-3 activation. We therefore speculate that Y2 phosphorylation could inhibit caspase-dependent cleavage of MET, resulting in higher p40MET generation in Y2F mutants. Therefore, we artificially induced MET phosphorylation by treating the MDCK stable cell lines with the phosphatase inhibitor sodium orthovanadate (Na_3VO_4) and verified phosphorylation level of MET receptors using specific antibodies raised against phosphorylated MET (Fig. 5A). Cellular extracts were then incubated with purified active caspase-3 and we observed impaired generation of p40 MET from

phosphorylated TRK-MET WT. In contrast, the TRK-MET Y2F mutant did not impair MET cleavage, since a fragment appeared with a higher apparent molecular weight. This fragment was generated from a phosphorylated TRK-MET, and was detected using antibodies against phosphorylated MET, demonstrating that it is a phosphorylated form of p40 MET. Therefore, we demonstrated that Y2 phosphorylation inhibits caspase cleavage of MET. Conversely, we performed a dephosphorylation of TRK-MET WT using calf intestine phosphatase (CIP). Transient transfection of TRK-MET WT in HEK293T cells produced a high expression level which induce receptor autophosphorylation, as verified using antibodies against phosphorylated MET (Fig. 5B). After immunoprecipitation of the TRK-MET, proteins were treated by CIP, in order to dephosphorylate the receptors. Then, incubation with purified active caspase-3 showed an increase of p40 MET generation when TRK-MET was not phosphorylated, demonstrating that autophosphorylation of MET is correlated with the inhibition of its cleavage by caspase.

Taken together, we demonstrated that autophosphorylation of MET receptor within the juxtamembrane region on Y2 protect the receptor from caspase cleavage. We reported here a direct mechanism for preventing an activated MET degradation within apoptosis.

Modeling analysis of caspase-3 interaction with a juxtamembrane peptide of MET

In order to explain how phosphorylation of Y2 can protect caspase-dependent cleavage of MET, we examined the recognition of the MET caspase site sequence using available structures of caspase-3 in complex with various peptide-based inhibitors (Becker et al., 2004). In particular, we took advantage of the crystal structure of a bromomethoxyphenyl inhibitor (Protein Data Bank code: 1RHQ) in complex with caspase-3, because the phenyl group of this inhibitor allowed to precisely position Y2 from the ESVDY sequence of MET within the caspase-3 binding site. We observed that the presence of a tyrosine is favorable for the MET-caspase-3 interaction, as the hydroxyl group of Y2 may form a hydrogen bond with the carboxylate side chain of E239, a residue which shows a well conserved conformation in all reported crystal structures of caspase-3 complexes. It appears that the phosphorylation of Y2 does not allow proper recognition between caspase-3 and the MET peptide (Fig. 6A,B). Indeed, the negatively charged phosphoryl group of Y2 collides with the negatively charged side chain carboxylate of E239 of caspase-3, causing charge repulsion and also steric hindrance (Fig. 6B). This modeling analysis therefore indicates that the correct recognition of the ESVDY peptide sequence of MET by caspase-3 is not allowed when Y2 is phosphorylated.

We further examined the possible consequence of the V999A mutation, that was found to abolish the caspase-dependent cleavage of MET. The valine residue is found to interact within an aromatic pocket defined by the side chains of W340, F381 and Y338 of caspase-3 while the alanine mutation does not allow to fill the cavity formed by these residues (Fig. 6C,D). Hydrophobic interactions between V999 and the aromatic cluster may thus be required to allow correct recognition of the ESVD sequence by the caspase-3 binding site.

The modeling study indicate that phosphorylated Y2 cannot bind within the active site of caspase-3, while it can recruit CBL. The phosphorylation status of MET may distinguish their recognition site for each of its partner.

Despite the large number of proteins that become cleaved during apoptosis by caspase activity, only some of them have been shown to be protected directly by phosphorylation, including Bid (Desagher et al., 2001), I κ B (Barkett et al., 1997), presenilin 1 (PS1) (Fluhrer et al., 2004) or PS2 (Walter et al., 1999). Most of the phosphorylation sites responsible for prevention of caspase cleavage are serine residues, adjacent to the essential aspartate residue (Tozser et al., 2003). To our knowledge, the tyrosine Y751 of p130cas was the only phosphorylated tyrosine reported to prevent caspase cleavage (Hoon Kim et al., 2003), even this residue is located 3 amino acids further than the essential D748. Our data provides the first evidence of direct prevention of caspase cleavage by autophosphorylation of a tyrosine kinase receptor, with the direct inhibition supported by a modeling analysis.

In the normal functioning of the MET receptor, its activation induces its phosphorylation and favors cell survival. In contrast, p40 MET, generated by a caspase-dependent cleavage of full MET receptor, is able to induce itself apoptosis. The inhibition of caspase cleavage of MET at the molecular level by phosphorylation nearby the caspase motif could contribute to resist to apoptosis, by preventing p40 MET fragment generation, in addition to anti-apoptotic pathways induced by the activated MET receptor. Therefore, a MET receptor could then be considered as a sensor of apoptosis, since its biological response will be drastically different in presence or absence of its ligand when cells are exposed to apoptotic conditions.

MATERIAL & METHODS

Antibodies and other reagents. Anisomycin and MG101 were purchased from Calbiochem, CIP from New England Biolabs, Sodium orthovanadate (Na₃VO₄) from Sigma. The following MET antibodies were used : monoclonal anti-mouse intracellular MET (B-2, Santa Cruz) for immunoblotting, polyclonal anti-mouse intracellular MET (SP260, Santa Cruz) for

immunoprecipitating, polyclonal anti-phospho Y8-9 MET (UBI) and polyclonal anti-phospho Y2 MET (Biosource). Monoclonal anti-V5 epitope was purchased from Invitrogen, monoclonal anti-HA epitope from Babco (16B12) and polyclonal anti-active (cleaved) caspase-3 (#9661) from Cell Signaling Technology. The secondary antibodies used for immunoblotting were peroxidase conjugated anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG (Jackson Immunoresearch).

Cell culture. Madin-Darby Canine kidney (MDCK) epithelial cells and 293T human embryonal kidney cells (HEK293T) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL) and antibiotics.

Plasmids construction. The TRK-MET V5 HIS chimeras were previously described (Tulasne et al., 2004). Site-directed mutagenesis was performed using QuickChange system from Stratagene. The following oligos were used :

E997A : 5' CAAATGCGTCTGTAGACTACAGAGCTAC 3',

S998A : 5' CAAATGAGGCTGTAGACTACAGAGCTAC 3',

V999A : 5' CAAATGAGTCTGCAGACTACAGAGCTAC 3'

and complementary primers. Insertion of the mutation was verified by DNA sequencing. The TKB-CBL HA plasmid was kindly provided by Lene Melsæther Grøvdal (Institute of Pathology, University of Oslo, Oslo, Norway)

Transfection and stable cell lines. Transient transfections of MDCK cells were performed using the lipofection method, as described previously (Tulasne et al., 1999). Stable cell lines were obtained after adding geneticin (Gibco BRL) at 800 µg/ml for 2 weeks. Transient transfections of HEK293T cells were performed with PEI/Exgen 500 (Euromedex) following manufacturer's instructions.

Immunoprecipitation and immunoblotting. Immunoprecipitation was performed by adding appropriate antibody into cellular extracts for a night, then protein A sepharose-4B (Amersham Biosciences) was added for 1 h. After 4 washes with lysis buffer, the samples were boiled and analyzed by immunoblotting, as described previously (Paumelle et al., 2002).

Caspase cleavage assay. MDCK cells ($3 \cdot 10^5$ cells / 6-well plates) were cultured one day in DMEM-10% FBS and then lysed in 100 µl of caspase buffer (20 mM PIPES pH 7.2; 100 mM NaCl; 1% Chaps; 10% sucrose; 5 mM DTT; 0.05 mM EDTA). Cellular extracts were incubated 4 h at 37°C with 1 µl of purified active caspase-3. Proteins were then separated on SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting. Purified active caspase-3 were generously provided by Dr. G.S. Salvesen (The Burnham Institute, La Jolla, ca, USA).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNRS, Pasteur Institute of Lille, USTL and INSERM, and by grants from Fondation de France, Ligue Régionale contre le Cancer and Région Nord-Pas de Calais - FEDER. JD wants to thank ARERS and ARC for their research fellowships. ZJ was financially supported by Fondation de France. VV is a recipient of an Action Thématique et Incitative sur Programme Jeunes Chercheurs Grant from the CNRS.

REFERENCES

- Barkett, M., Xue, D., Horvitz, H.R. and Gilmore, T.D. (1997) Phosphorylation of IkappaB-alpha inhibits its cleavage by caspase CPP32 in vitro. *J Biol Chem*, **272**, 29419-29422.
- Becker, J.W., Rotonda, J., Soisson, S.M., Aspiotis, R., Bayly, C., Francoeur, S., Gallant, M., Garcia-Calvo, M., Giroux, A., Grimm, E., Han, Y., McKay, D., Nicholson, D.W., Peterson, E., Renaud, J., Roy, S., Thornberry, N. and Zamboni, R. (2004) Reducing the peptidyl features of caspase-3 inhibitors: a structural analysis. *J Med Chem*, **47**, 2466-2474.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E. and Vande Woude, G.F. (2003) Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 915-925.
- Carter, S., Urbe, S. and Clague, M.J. (2004) The met receptor degradation pathway: requirement for Lys48-linked polyubiquitin independent of proteasome activity. *J Biol Chem*, **279**, 52835-52839.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B. and Martinou, J.C. (2001) Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell*, **8**, 601-611.
- Fluhrer, R., Friedlein, A., Haass, C. and Walter, J. (2004) Phosphorylation of presenilin 1 at the caspase recognition site regulates its proteolytic processing and the progression of apoptosis. *J Biol Chem*, **279**, 1585-1593.
- Hammond, D.E., Carter, S., McCullough, J., Urbe, S., Vande Woude, G. and Clague, M.J. (2003) Endosomal dynamics of Met determine signaling output. *Mol Biol Cell*, **14**, 1346-1354.
- Hoon Kim, D., Jeon Choi, S., Kook, S., Kim, W. and Keun Song, W. (2003) Phosphorylation-dependent cleavage of p130cas in apoptotic rat-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **300**, 141-148.

- Jeffers, M., Schmidt, L., Nakaigawa, N., Webb, C.P., Weirich, G., Kishida, T., Zbar, B. and Vande Woude, G.F. (1997) Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11445-11450.
- Kong-Beltran, M., Stamos, J. and Wickramasinghe, D. (2004) The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation. *Cancer Cell*, **6**, 75-84.
- Paumelle, R., Tulasne, D., Kherrouche, Z., Plaza, S., Leroy, C., Reveneau, S., Vandebunder, B. and Fafeur, V. (2002) Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene*, **21**, 2309-2319.
- Peschard, P., Fournier, T.M., Lamorte, L., Naujokas, M.A., Band, H., Langdon, W.Y. and Park, M. (2001) Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell*, **8**, 995-1004.
- Peschard, P., Ishiyama, N., Lin, T., Lipkowitz, S. and Park, M. (2004) A conserved DpYR motif in the juxtamembrane domain of the Met receptor family forms an atypical c-Cbl/Cbl-b tyrosine kinase binding domain binding site required for suppression of oncogenic activation. *J Biol Chem*, **279**, 29565-29571.
- Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G. and Comoglio, P.M. (1994) A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell*, **77**, 261-271.
- Taher, T.E., Tjin, E.P., Beuling, E.A., Borst, J., Spaargaren, M. and Pals, S.T. (2002) c-Cbl is involved in Met signaling in B cells and mediates hepatocyte growth factor-induced receptor ubiquitination. *J Immunol*, **169**, 3793-3800.
- Talanian, R.V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M.C., Mankovich, J.A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K.D. and Wong, W.W. (1997) Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem*, **272**, 9677-9682.
- Tozser, J., Bagossi, P., Zahuczky, G., Specht, S.I., Majerova, E. and Copeland, T.D. (2003) Effect of caspase cleavage-site phosphorylation on proteolysis. *Biochem J*, **372**, 137-143.
- Tulasne, D., Deheuninck, J., Lourenco, F.C., Lamballe, F., Ji, Z., Leroy, C., Puchois, E., Moumen, A., Maina, F., Mehlen, P. and Fafeur, V. (2004) Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. *Mol Cell Biol*, **24**, 10328-10339.

- Tulasne, D., Paumelle, R., Weidner, K.M., Vandebunder, B. and Fafeur, V. (1999) The multisubstrate docking site of the MET receptor is dispensable for MET-mediated RAS signaling and cell scattering. *Mol Biol Cell*, **10**, 551-565.
- Vigna, E., Gramaglia, D., Longati, P., Bardelli, A. and Comoglio, P.M. (1999) Loss of the exon encoding the juxtamembrane domain is essential for the oncogenic activation of TPR-MET. *Oncogene*, **18**, 4275-4281.
- Walter, J., Schindzielorz, A., Grunberg, J. and Haass, C. (1999) Phosphorylation of presenilin-2 regulates its cleavage by caspases and retards progression of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1391-1396.
- Weidner, K.M., Sachs, M., Riethmacher, D. and Birchmeier, W. (1995) Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2597-2601.
- Zhang, Y.W. and Vande Woude, G.F. (2003) HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *J Cell Biochem*, **88**, 408-417.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. **Caspase site and CBL interaction motif overlap in MET juxtamembrane region.** Bottom : The multiple alignment was performed using clustalw program (www.ebi.ac.uk/clustalw/) with available sequences of MET.

Figure 2. **V999A and D1000N are crucial for caspase-dependent cleavage of MET.** A. MDCK cells were transiently transfected with plasmids expressing TRK-MET WT or mutants. Protein lysates were collected in caspase buffer and purified active caspase 3 was added as indicated. After 4 h incubation at 37°C, proteins were immunoblotted with an anti-MET antibody. B. MDCK cells stably expressing empty vector, TRK-MET WT or mutants E997A, S998A, V999A, D1000N and Y2F were treated by anisomycin (50 µM) as indicated for 10 h in presence of MG101 (50 µM), a proteasome inhibitor. Cell extracts are immunoblotted with an anti-MET antibody. The membrane was reprobed with an anti-active caspase 3 antibody.

Figure 3. **V999A mutation does not impair CBL recruitment.** A. HEK293 cells were transiently transfected with plasmids expressing V5 tagged TRK-MET WT or mutants and HA tagged TKB-CBL (ratio 3/4 – 1/4). Cell lysates were subjected to immunoprecipitation (IP) with MET antibody followed by immunoblotting with HA antibody. The membrane was reprobed with V5 antibody. B. MDCK cells stably expressing TRK-MET WT or mutants were seeded at low confluence (2500 cells / 12-well plates) and pictures were taken the following day.

Figure 4. **Both V999A and D1000N abrogated caspase-dependent cleavage of MET.** MDCK cells (6 well plates – 150.000 cells) were transiently transfected with different plasmids expressing TRK-MET mutants. The day after, cells were treated with staurosporin (100 nM) or not for 8 h. Cells were scrapped and proteins were separated by 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting with MET antibodies. The membrane was reprobed with phosphoY2 MET antibodies. Same extracts were separated in 12% acrylamide gel to detect caspase 3 activation and phosphoY8-9 MET.

Figure 5. **Y2 phosphorylation inhibits caspase cleavage.** A. MDCK stable cell lines expressing TRK-MET WT or Y2F were treated or not with Na₃VO₄ for 10 min. Proteins

extracts were incubated with or without purified active caspase 3 for 4 h at 37°C before analysis by immunoblotting with anti-MET antibody. The membrane was re probed with anti-phosphoY8-9 MET. B. HEK293T cells were transfected with TRK-MET WT plasmid. Protein lysates were subjected to immunoprecipitation using anti-MET antibody. After washing, immunoprecipitated proteins were suspended in caspase buffer and Calf Intestine Phosphatase (CIP) was added as indicated, for 1 h at 37°C. Then, purified active caspase 3 was added to sample for a further incubation of 4 h at 37°C. Immunoblotting with anti-MET antibody was performed. The membrane was re probed with anti-phosphoY8-9 MET antibody.

Figure 6. Molecular model of the binding of the ESVDY MET peptide to caspase 3. A. The MET peptide ESVDY was modeled based on the crystal structure of the complex of caspase-3 with a bromomethoxyphenyl inhibitor (PDB code : 1RHQ) (Becker et al., 2004). This inhibitor contains, adjacent to amino acids Val-Asp, a ((methylsulfanyl)methyl)benzene group mimicking a Phe residue, thus allowing to model the VDY sequence of the MET peptide. The hydroxyl group of the tyrosine may form a hydrogen bond with the side chain oxygens of E239. The rest of the MET peptide has been modeled based on the crystal structure of the complex of caspase-3 with an inhibitor containing notably the amino acid sequence DEVD (PDB entry code 1RHK; Becker et al., 2004), thus allowing to position the ES adjacent to the VD residues, in the ESVDY MET peptide. The caspase-3 is represented as a molecular surface, with nitrogens coloured in blue, oxygens in red, carbons in white and sulfurs in orange. The MET peptide is in sticks. B. Representation of the phosphorylated MET peptide in the caspase-3 active site. Here, the phosphorylated tyrosine lies too close to the carboxylate side chain of E239, causing charge repulsion and steric hindrance. C. Close-up view of the valine residue from the MET peptide, bound in a pocket defined by the aromatic side chains of W340, F381 and Y338 of caspase 3. The valine position is as observed in the crystal structures 1RHQ and 1RHK. D. Illustration of the alanine mutation and the loss of hydrophobic interactions between the MET peptide and the W340, F381 and Y338 residues from the caspase 3. The figures have been generated using PyMol (DeLano Scientific).

Figure 1

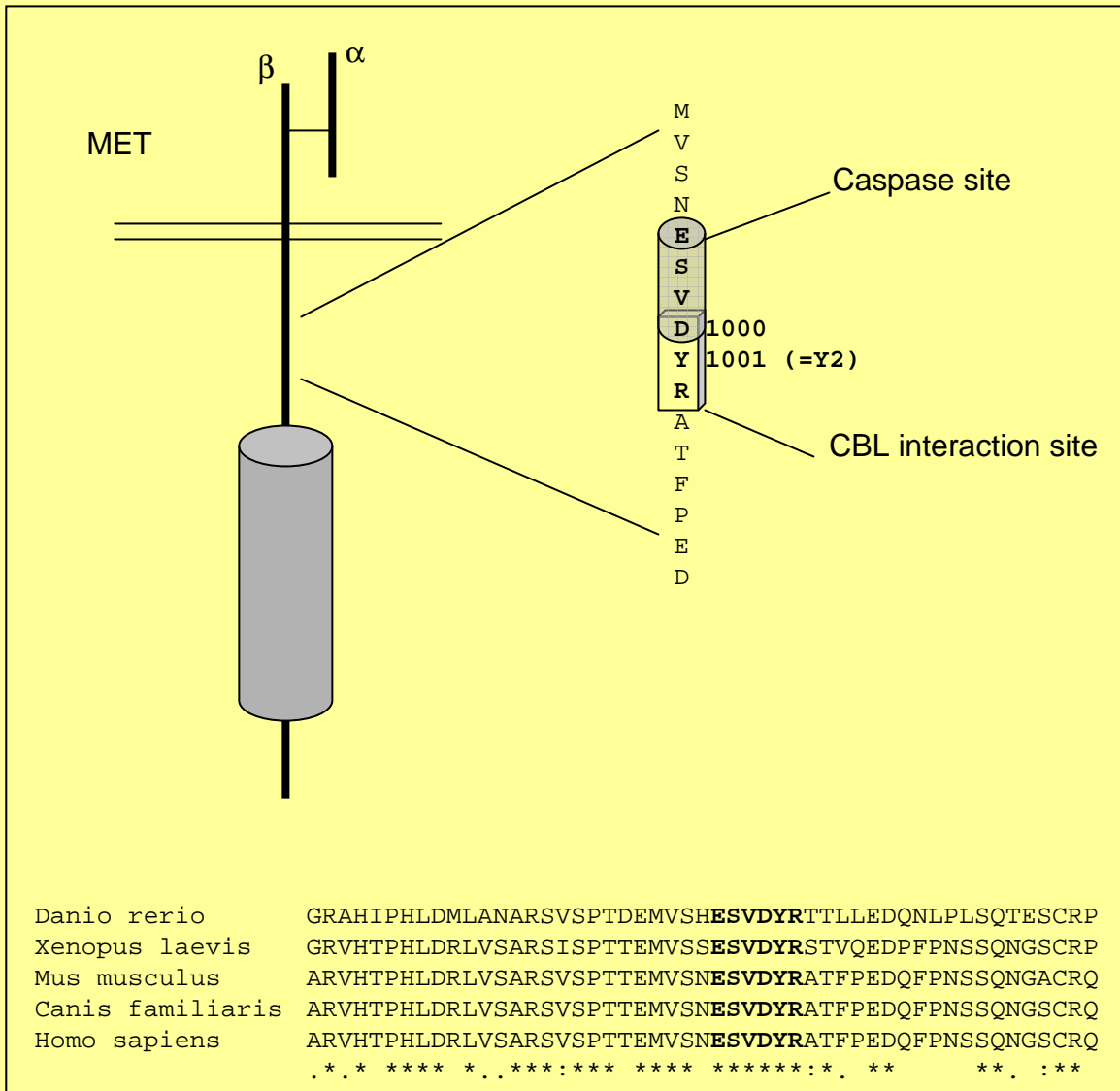


Figure 2

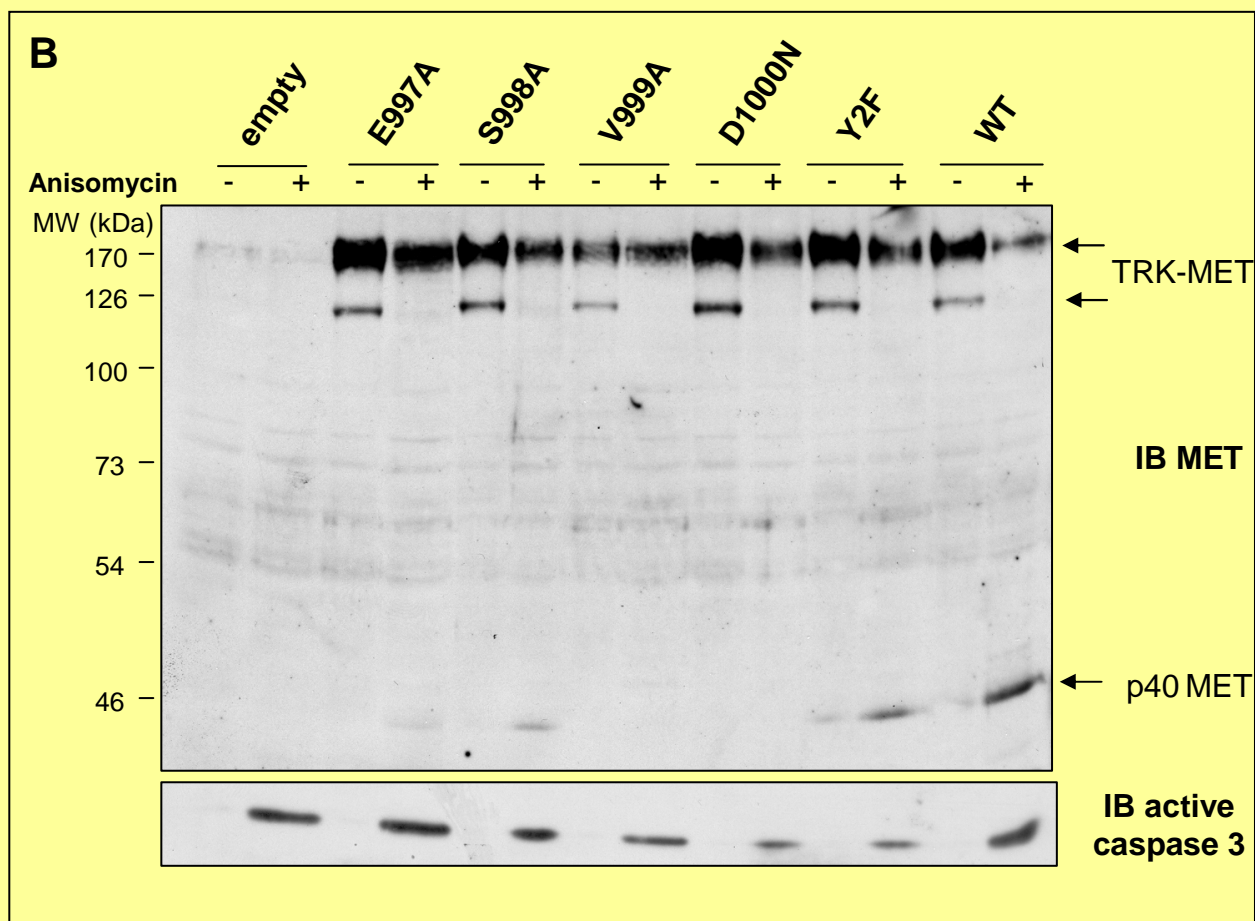
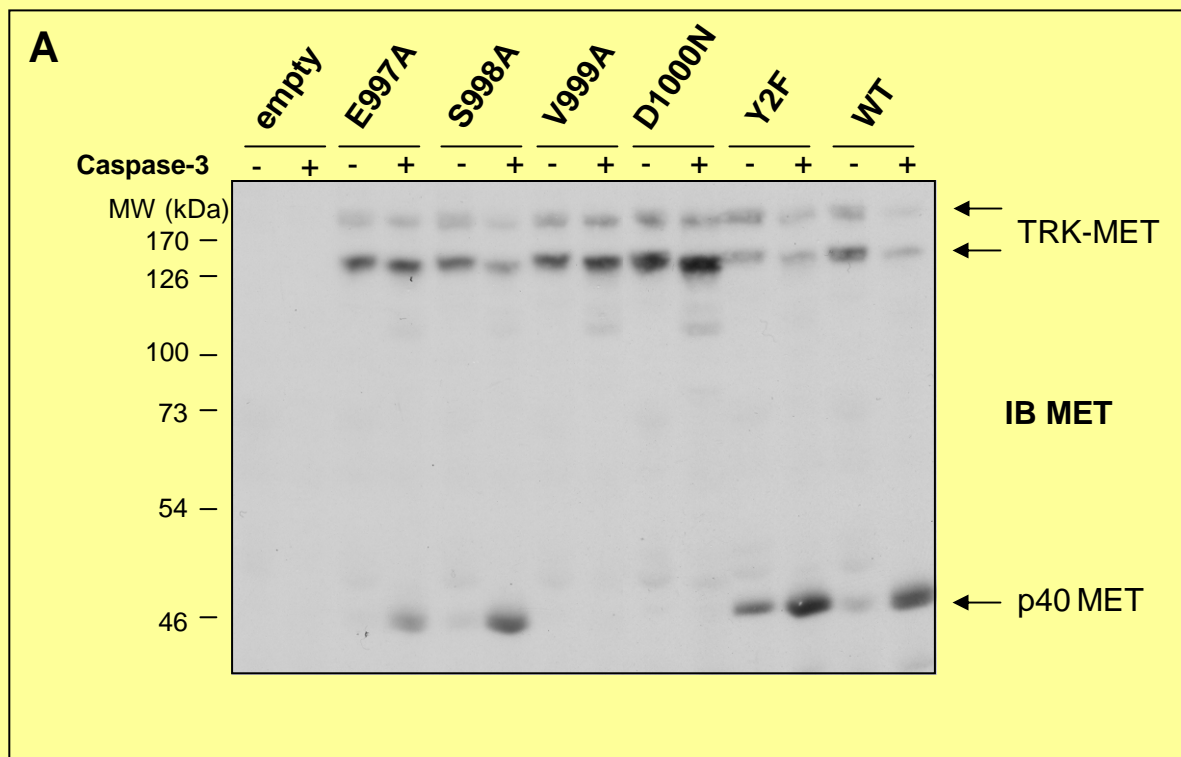
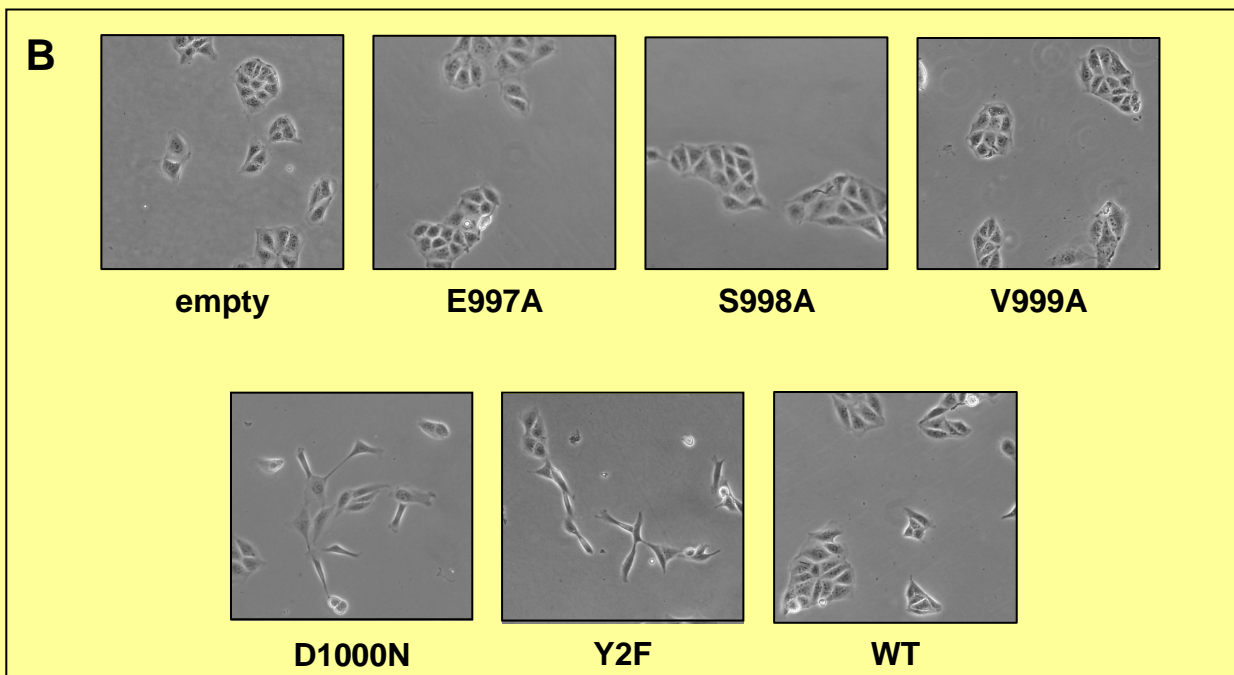
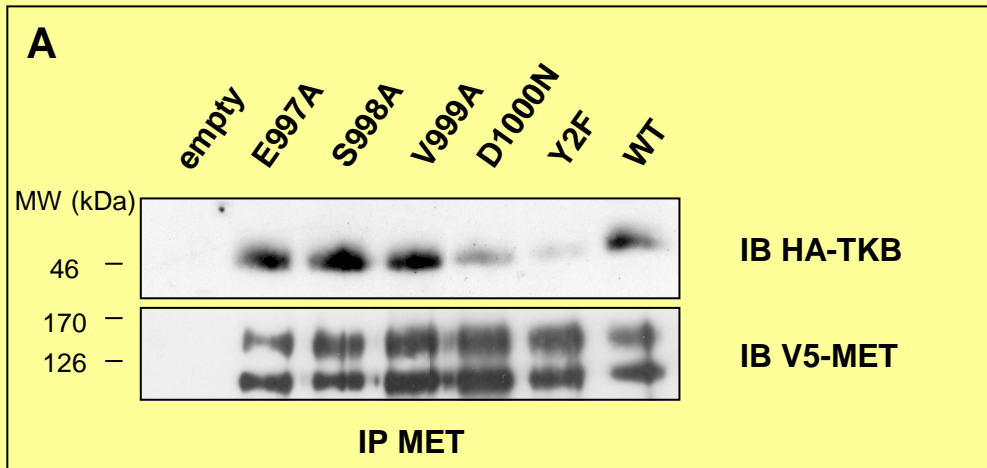


Figure 3



C

	E997A	S998A	V999A	D1000N	Y2F	WT
Caspase cleavage	+	+	-	-	+	+
CBL interaction	+	+	+	-	-	+

Uncleavable Uncleavable and activated Activated

Figure 5

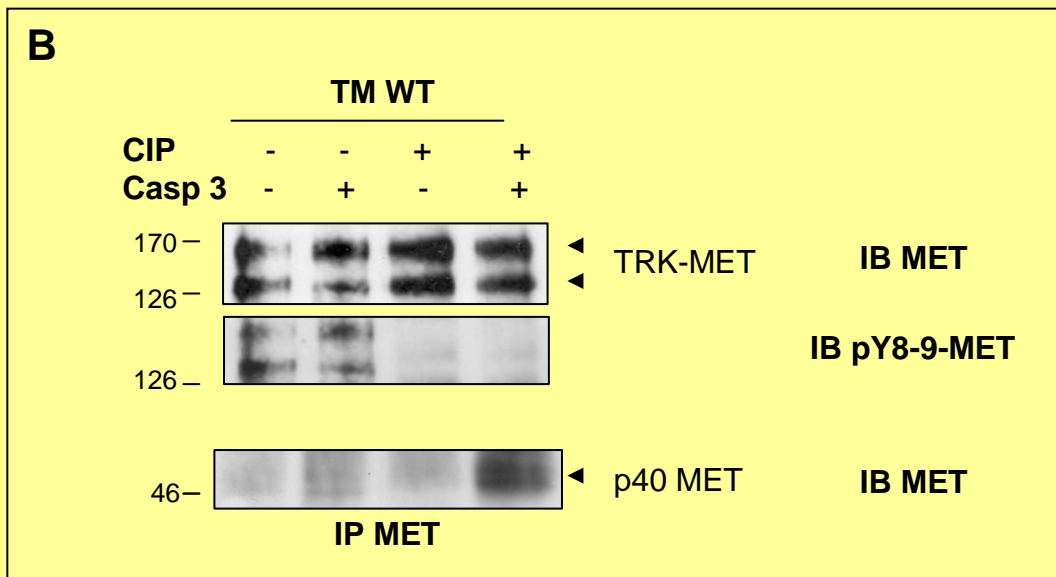
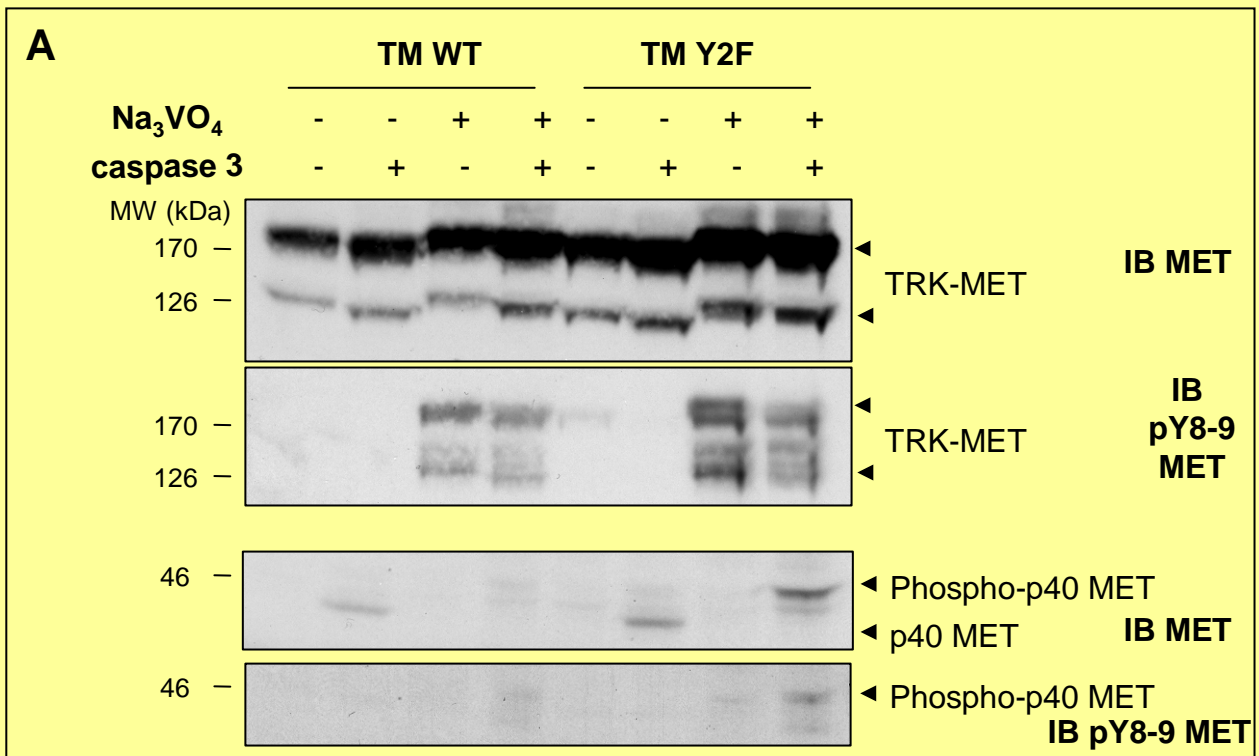
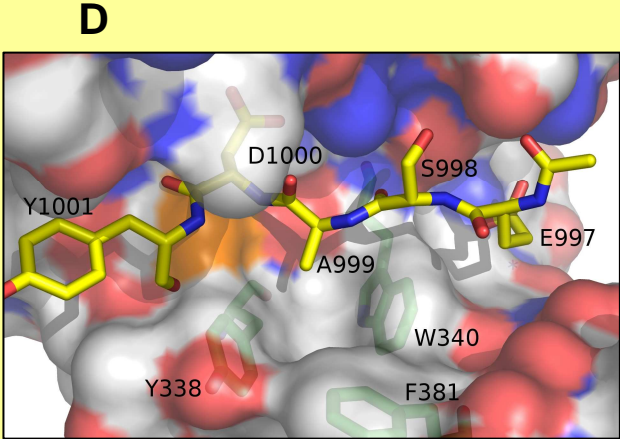
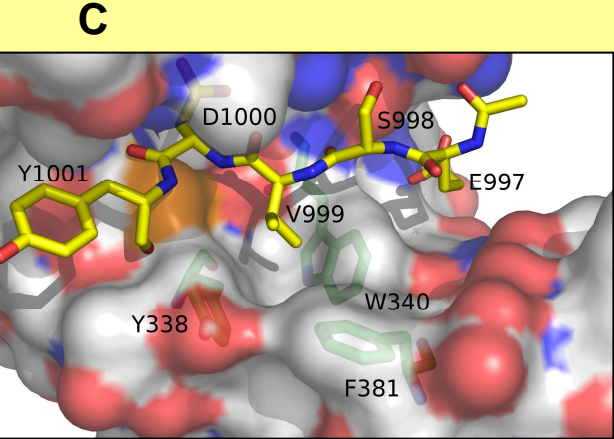
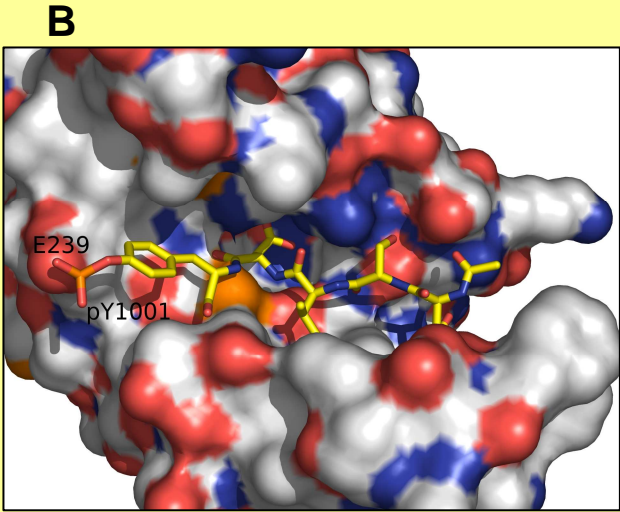
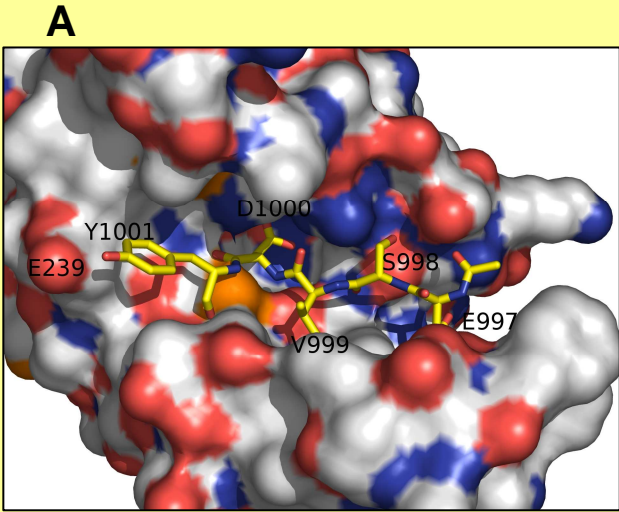


Figure 6



2. Conclusion

Nous avons donc montré que les deux sites juxtaposés que sont le site caspase (ESVD) et le site de recrutement de CBL (DYR) sont séparables en utilisant des mutants spécifiques. Ceci était le pré-requis pour commencer la recherche pour déterminer si le récepteur MET peut amplifier le processus d'apoptose, via la génération du fragment p40 MET. De plus, nous avons également découvert un moyen de régulation direct du clivage caspase par l'activation du récepteur. Ce mécanisme moléculaire de prévention d'un clivage caspase par phosphorylation a déjà été décrit pour d'autres molécules, mais très souvent par la phosphorylation de résidus sérines. Nous avons décrit ici un mécanisme de régulation par autophosphorylation du récepteur MET empêchant son clivage par les caspases.

Ces travaux ont d'abord été soumis d'abord à Embo J. en avril 2006. Il a été refusé par l'éditeur car les résultats ne lui semblaient pas suffisamment originaux pour leur journal. En effet, le clivage caspase était déjà connu, la mutation D1000N également, et nous ne proposons donc qu'un raffinement de ces connaissances. Nous avons ensuite soumis ce même travail à J. Biol. Chem. en mai 2006. L'éditeur a également refusé nos travaux, mais avec assez peu de critiques. L'objection majeure était que le mutant V999A se comportait comme un récepteur sauvage, car n'avait aucun effet phénotypique au contraire du mutant D1000N, et de fait, n'était pas intéressant.

Afin d'éviter cette sensation de mutation « inutile », une nouvelle écriture plus centrée sur le résultat final, à savoir la phosphorylation de MET empêche son clivage par les caspases est en cours. De plus, nous cherchons à améliorer la qualité du travail, en y incluant des expériences permettant de relier ce mécanisme à un processus pathologique, et en particulier, le cancer. En effet, de nombreuses mutations activatrices ont été décrites dans la séquence de MET et corrélés à l'émergence de cancer. L'espoir est de montrer qu'une mutation activatrice active et phosphoryle le récepteur, et donc empêche son clivage par les caspases, et ainsi, ne génère pas de fragment p40 MET. Nous souhaitons donc montrer que ces mutations participent à une résistance à l'apoptose, via l'empêchement de la génération du fragment p40 MET.

Discussion
Conclusion

DISCUSSION

Nous avons donc montré que le récepteur tyrosine kinase MET, dont l'activation par son ligand l'HGF/SF induit la dispersion, la morphogénèse et la survie des cellules épithéliales, est acteur du processus d'apoptose. Il est une cible des caspases, permettant la génération de fragments fonctionnels, un fragment cytosolique qui possède des capacités pro-apoptotiques, et un fragment transmembranaire qui devient un récepteur-leurre pour le ligand. De plus, nous avons montré que le clivage du récepteur MET par les caspases était régulé par l'activation du récepteur, un récepteur activé ne pouvant plus être clivé par les caspases. Ces résultats démontrent une relation importante entre un récepteur de survie et la survenue de la mort cellulaire par le mécanisme d'apoptose.

I. Le couple HGF/SF-MET induit la survie

Les travaux sur le récepteur MET et son ligand l'HGF/SF se sont largement orientés sur leurs capacités à induire la dispersion et la morphogénèse des cellules épithéliales. La fonction survie du couple a été initialement décrite sur les hépatocytes lors de la régénération du foie (Eguchi et al., 1996; Hamanoue et al., 1992), puis élargi à d'autres types de cellules, comme les cellules rénales (Kawaida et al., 1994), pulmonaires (Yanagita et al., 1993) ou neuronales (Maina et al., 1997).

Il est généralement admis que les acteurs moléculaires principaux réalisant les effets de survie induits par l'HGF/SF est la voie PI3K-AKT (Fan et al., 2000). Au sein du laboratoire, nous avons montré que la voie de survie induite par l'HGF/SF pouvait être régulé par l'inhibition de la voie JNK (Paumelle et al., 2000), ce qui pouvait permettre de contrarier l'apoptose induite par un récepteur de mort, le récepteur au TNF- α [Annexe 1 : **Inhibition of JNK by HGF/SF prevents apoptosis induced by TNF- α** . Sylvie REVENEAU, Réjane PAUMELLE, Julien DEHEUNINCK, Catherine LEROY, Yvan de LAUNOIT and Véronique FAFEUR. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1010:100-103 (2003)]

Ces travaux ont permis de confirmer l'inhibition de JNK par un traitement HGF/SF des cellules, en situation physiologique, après son induction par un récepteur de mort par exemple, le TNFR. La MAPK JNK peut être présentée comme un nœud de signalisation, dont

la répression ou l'activation fait partie de la régulation du déclenchement du processus d'apoptose. La répression de JNK par l'HGF/SF, via la voie ERK ou la voie PI3K, permet de protéger les cellules de l'apoptose, et favorise ainsi l'effet de survie induit par l'HGF/SF.

Pour aller plus loin dans la compréhension des effets de survie de l'HGF/SF dans des cellules épithéliales, nous avons entrepris de rechercher les gènes-cibles de l'HGF/SF dans des cellules épithéliales. Tout d'abord, il fallait rechercher les cellules les plus appropriées à ce type d'étude : afin de pouvoir utiliser les biopuces à ADN, il était nécessaire d'utiliser des cellules humaines. L'essentiel des travaux de signalisation de l'HGF/SF sont réalisés dans les cellules MDCK, qui sont des cellules de chien, et donc, il a fallu en chercher d'autres. Pour cela, nous avons établi un cahier des charges que les cellules devaient remplir pour être les meilleures. Ces recherches ont constitué une bonne partie de mon travail de DEA. Nous en avons conclu que les cellules MCF-10A, qui sont des cellules épithéliales mammaires non tumorigènes dans des souris nude, étaient de très bonnes candidates pour étudier la signalisation de l'HGF/SF dans des cellules humaines (voir la figure 1 de l'annexe 2).

Les résultats ont permis la mise en évidence de trois cibles précoces de l'HGF/SF dans les cellules épithéliales mammaires, cohérents par rapport à leurs fonctions connues dans la survie et l'apoptose : A20, une protéine anti-apoptotique est régulé positivement, alors que SMAC/DIABLO, une protéine pro-apoptotique est régulé négativement, ainsi que la protéine DAXX, dont la fonction anti-ou pro-apoptotique est plus controversée.

Ces travaux seront actuellement sous presse dans *Annals of N Y academy of Sciences* [Annexe 2 : **HGF/SF regulates expression of apoptotic genes in MCF-10A human mammary epithelial cells.** Catherine LEROY, Julien DEHEUNINCK, Sylvie REVENEAU, Bénédicte FOVEAU, Zongling JI, Céline VILLENET, Sabine QUIEF, David TULASNE, Jean-Pierre KERCKAERT and Véronique FAFEUR. *Ann. N Y Acad. Sci.* (2006)]

En opposition à l'implication de l'HGF/SF et de MET dans la survie des cellules, il a été décrit des effets cytotoxique de l'HGF/SF. En effet, les cellules HepG2, Meth A ou sarcoma 180 arrêtent de proliférer après traitement à l'HGF/SF (Higashio and Shima, 1993; Tajima et al., 1991). Plusieurs explications ont été apportées pour expliquer ce phénomène, tel que la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Arakaki et al., 1999), l'activation soutenue de ERK (Tsukada et al., 2001), conduisant à la répression de CDK2 (Tsukada et al., 2004), et à la régulation positive de p16^{INK4a} (Han et al., 2005).

Bien que ces travaux restent marginaux, cette dualité de l'HGF/SF est intéressante, puisque nos travaux ont permis de dévoiler un effet pro-apoptotique du récepteur de survie MET suite à son clivage par les caspases.

II. Le récepteur MET est un double substrat des caspases.

Au sein du laboratoire, nos recherches sur le récepteur MET nous ont amené à créer de nombreux mutants et autres chimères contenant des régions du récepteur. Nous utilisons notamment des récepteurs chimères constitué de la région extracellulaire du récepteur au NGF (Nerve Growth Factor), le récepteur TRK A, fusionné à la région intracellulaire et transmembranaire du récepteur MET. Ces récepteurs permettent de travailler dans des cellules exprimant le récepteur MET mais pas le récepteur TRK A, en interrogeant spécifiquement un MET muté grâce au NGF, sans activer le MET endogène (Tulasne et al., 1999; Weidner et al., 1993). Le plasmide codant le récepteur chimère TRK-MET est un plasmide de type « pbat », dont les sites de clonage sont mal identifiés et le niveau d'expression assez faible. Ainsi, nous avons entrepris de cloner cette chimère dans un plasmide de type « pcDNA3 », mieux caractérisé et plus facile à manipuler. Tout en changeant de plasmide, nous avons décidé d'ajouter une étiquette C-terminale au récepteur, de manière à l'identifier plus facilement en immunoblot ou en immunofluorescence, ou de l'immunoprécipiter plus fortement. Ainsi, nous avons ajouté une étiquette V5-HIS en phase avec le récepteur, qui suit sa région C-terminale.

En exprimant cette construction dans les cellules MDCK, nous avons vérifié que le récepteur s'exprimait correctement, et qu'il était bien étiqueté. De manière surprenante, nous avons observé que le fragment p40 MET n'était pas détectable en utilisant l'anticorps anti-V5, alors qu'il était bien visible en utilisant un anticorps dirigé contre MET. Après analyse de la séquence du récepteur, nous avons identifié un nouveau site potentiel de clivage par les caspases.

La caractérisation et les conséquences fonctionnelles de ce deuxième site sont présentées dans la publication suivante : Annexe 3 : **Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor**. Bénédicte FOVEAU, Catherine LEROY, Frédéric ANCOT, Julien DEHEUNINCK, Zongling JI, Véronique FAFEUR and David TULASNE. *En révision à Cell Death and differentiation*.

Nous avons donc montré que le récepteur MET était une cible des caspases en deux régions distinctes, sur un site ESVD hautement conservé dans la région juxtamembranaire, et sur un site C-terminal, absent chez les amphibiens et les poissons, présent chez les mammifères, et dupliqué chez les grands singes et l'homme. Nous avons de plus montré que ces clivages étaient réalisés de façon séquentielle, d'abord dans la région C-terminale, puis

dans la région juxtamembranaire, et qu'en empêchant le clivage C-terminal, on inhibe le clivage juxtamembranaire. Enfin, nous avons montré que le clivage C-terminal favorise l'apoptose induite par le fragment p40 MET.

En conclusion, nous pouvons dire que l'apoptose induit un remodelage du récepteur MET, en le clivant en deux endroits, et induisant la création d'un fragment de MET capable d'amplifier l'apoptose.

Une autre fonction cruciale demeure. Nous avons montré que le clivage C-terminal précédait le clivage juxtamembranaire, et que de fait, au cours de l'apoptose, le récepteur MET existait sous une forme tronquée dans la région C-terminale, mais pas encore clivé dans la région juxtamembranaire. Cette forme courte du récepteur devient même majoritaire, à un moment où l'apoptose n'est peut-être pas encore définitive. Nous cherchons à savoir quelles propriétés pourrait avoir cette forme courte du récepteur : Elle pourrait soit favoriser l'apoptose, soit au contraire l'empêcher, MET servant alors de senseur à une apoptose « douce » ou une apoptose « massive ». Elle peut également n'avoir aucun rôle particulier sur le récepteur de pleine longueur mais être importante pour l'activité pro-apoptotique du fragment p40 MET. Nous allons tester quelques hypothèses qui nous semblent intéressantes : Retirer au récepteur MET une séquence C-terminale si courte peut-elle avoir un effet sur son activité ? Certains résidus pourraient être modifiés post-traductionnellement, par phosphorylation ou par glycosylation, ce qui pourrait également être important. Egalement, la stabilité d'une protéine est généralement médiée par son extrémité C-terminale, la tronquer pourrait réduire, ou au contraire augmenter sa stabilité. Enfin, la localisation d'un récepteur dans une région de membrane est parfois régulée par son extrémité C-terminale, est-ce le cas pour MET ?

III. Comment p40 MET induit-il l'apoptose ?

Après avoir découvert la génération de p40 MET au cours de l'apoptose, son expression ectopique a permis de démontrer que ce fragment possédait un potentiel pro-apoptotique inattendu. La question qui s'est rapidement posée était la suivante : « comment le récepteur MET, lui-même anti-apoptotique, peut générer un fragment pro-apoptotique ? ». Autrement dit, qu'est-ce qui confère à p40 MET cette activité pro-apoptotique.

Différentes pistes ont été explorées pour répondre à cette question. Tout d'abord, la première idée était qu'un domaine tyrosine kinase libéré dans le cytoplasme (et donc non régulé) pouvait induire l'apoptose de manière indirecte, ressentie par la cellule comme une agression, dont elle se défend en induisant l'apoptose. Dans ce cas, comment expliquer qu'une chimère telle que TPR-MET (constituées de la région intracellulaire du récepteur fusionnée à un élément de dimérisation) soit transformante, alors que p40 MET, qui ne peut théoriquement se dimériser, bien qu'il soit phosphorylé dans les cellules, induise l'apoptose. Différents essais ont permis de comparer TPR-MET et p40 MET, qui correspondent à quelques détails près à la même séquence de MET, mais produisent des effets opposés. Il a été montré que p40 MET était capable d'interagir avec Grb2 ou Gab1, mais pas de les activer, pouvant devenir un piège à protéines de signalisation. Il a été également confirmé que p40 MET ne pouvait se dimériser.

La deuxième hypothèse est que p40 MET devienne un élément actif de l'induction de l'apoptose, en activant des voies spécifiques. Soit des voies différentes du MET de pleine longueur, soit des voies pré-existantes, dont le mode d'activation différent pourrait induire des effets opposés. Par exemple, la survie induite par l'HGF/SF passe majoritairement par la voie PI3K-AKT et la voie de la MAPK ERK, et a contrario, MET active la voie JNK de manière transitoire, alors qu'une activation prolongée de JNK peut mener à l'apoptose. Nous avons pensé que p40 MET aurait pu activer la voie JNK sans activer la voie ERK ou AKT, conduisant au mécanisme de l'apoptose par déroutage des voies de signalisation existantes. Malheureusement, cette hypothèse n'a pas pu être démontrée.

D'autres tentatives ont été réalisées, par exemple l'inhibition des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent également déclencher l'apoptose, ou encore le recrutement potentiel de DAPK3, mais sans succès.

A ce jour, nous n'avons donc pas pu répondre à cette question. Néanmoins, les avancées d'autres travaux, tels que le clivage C-terminal de MET, nous offre de nouvelles pistes qui pourraient nous amener à comprendre comment fonctionne le fragment p40 MET pour induire l'apoptose. L'utilisation de forme inductible de p40 MET pourra peut-être nous aider à répondre à cette question.

IV. Le récepteur MET peut être clivé par un autre mécanisme...

Outre le clivage caspase, d'autres types de clivage avaient déjà été décrit pour le récepteur MET. Tout d'abord, un clivage nécessaire à la maturation du récepteur qui sépare les chaînes α et β est réalisé par la furine (Komada et al., 1993). Ensuite, il existe un autre type de clivage réalisé dans la région extracellulaire du récepteur appelé élagage ou « shedding », par un mécanisme existant pour de nombreux récepteurs (TNF α , EGFR...). Ce clivage est réalisé par des metalloprotéases matricielles, et libère la région extracellulaire libre dans le milieu. Le shedding de MET est activé par l'activation de PKC, de l'EGF ou de récepteur couplé à la protéine G (Nath et al., 2001; Wajih et al., 2002) et corrèle avec le potentiel métastatique des cellules (Athauda et al., 2006). Pour l'heure, nous ne connaissons ni la protéase responsable, ni le site exact du clivage, et très peu d'éléments nous permettent de comprendre la fonction biologique de ce clivage.

Nous avons découvert que ce clivage extracellulaire n'est en fait qu'une étape et est suivi d'un deuxième, dans la région transmembranaire, par un processus baptisé RIP (regulated intramembrane proteolysis). Ce type de clivage a été très bien décrit pour la protéine APP (amyloid precursor protein), dont le clivage conduit à la formation de dépôts amyloïdes retrouvés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. La protéine APP est clivée d'abord par les α -secrétases dans la région extracellulaire, qui sont en fait les ADAMs responsable du shedding, ensuite un autre clivage a été baptisé β -secrétase et coupe également dans la région extracellulaire. Enfin, le petit fragment sortant de la cellule va être reconnu par un complexe multiprotéique appelé γ -secrétase qui va cliver le récepteur dans la région transmembranaire et libéré ainsi un fragment intracellulaire.

En utilisant des inhibiteurs pharmacologiques inhibant les metalloprotéases (GM6001) et la γ -secrétase (composé E et composé X) ainsi que des fibroblastes embryonnaires déficientes en préséniline 1 et 2 (qui porte l'activité catalytique du complexe γ -secrétase), nous avons mis en évidence le clivage séquentiel de MET par les secrétases. En effet, nous avons montré que MET subit l'élagage de son domaine extracellulaire par des metalloprotéases, conduisant à la génération d'un fragment membranaire de 55 kDa environ. Ensuite, ce fragment est clivé par la γ -secrétase, qui conduit à la génération d'un fragment d'environ 50 kDa, théoriquement cytosolique. Ce fragment est instable et n'est détecté qu'en présence d'un inhibiteur du protéasome.

Ces travaux sont en cours et il reste à déterminer les acteurs exacts de ce processus, les sites de clivages, et surtout le rôle et la fonction de ce processus dans la biologie du récepteur MET. La génération d'un fragment p50 MET et p40 MET, dans des conditions distinctes ont-elles des fonctions similaires ? Ce processus est-il tissu-spécifique ? Beaucoup de questions restent à creuser mais la découverte d'un nouveau processus de clivage pour MET est très enthousiasmante.

V. Le partenaire principal de MET, Gab1, est régulé comme MET

En étudiant la signalisation du récepteur MET, nous nous sommes particulièrement intéressés à Gab1, qui est le partenaire principal du récepteur MET. Ainsi, nous avons découvert que Gab1 et MET possédaient des systèmes de régulation identiques : ils sont tous les deux des cibles des caspases au cours de l'apoptose et ils sont tous les deux ubiquitinylés et dégradés en réponse à l'HGF/SF et l'activation de MET.

1. Par clivage caspase-dépendant

Nous avons montré que Gab1 est également un substrat des caspases, mais les sites de clivages sont beaucoup plus nombreux que pour MET. De ce fait, il a été délicat de les identifier, surtout qu'ils ne sont pas très consensuels. Néanmoins, nous sommes parvenus à la conclusion que Gab1 était dégradé par clivage caspase au cours du processus d'apoptose, et qu'un fragment d'environ 50 kDa contenant le domaine MBD (Met binding domain) était généré. Il reste à déterminer la fonction de ce fragment p50 Gab1, dans la signalisation de MET ou bien dans la fonction de p40 MET.

2. Par ubiquitinylation

Nous avons également pu montrer que Gab1, après son recrutement et sa phosphorylation en réponse à l'activation de MET par l'HGF/SF, était ubiquitinylable par un mécanisme dépendant de CBL, puis dégradé par une voie dépendante des inhibiteurs de

protéasome. Nous cherchons désormais à intégrer la dégradation de Gab1 dans la signalisation du récepteur MET, ou bien dans son trafic intracellulaire et sa dégradation.

CONCLUSION

Au cours de ces dernières années, nous avons découvert de nouveaux mécanismes de régulation du récepteur MET qui mettent en évidence que le récepteur MET est une cible fonctionnelle des caspases.

Les caspases clivent en deux endroits le récepteur MET, générant des fragments fonctionnels, et remodelant considérablement son activité. De plus, ces clivages ne sont pas uniquement passifs puisqu'ils sont régulés premièrement par l'activation du récepteur, et deuxièmement, l'un par l'autre.

Il reste beaucoup à faire pour comprendre les rôles de ces mécanismes dans la fonction du récepteur. MET est un récepteur impliqué dans de très nombreuses fonctions biologiques, et exprimé dans un grand nombre de types cellulaires. Il est important au cours du développement ainsi que lors de la vie adulte. Surtout, sa dérégulation est corrélée à l'apparition de nombreux cancers et métastases. Le récepteur MET est un nœud de signalisation, que tous ces mécanismes de régulation qu'on lui attribue, ses voies de signalisation nombreuses, sont dépendantes du contexte dans lequel le récepteur est exprimé.

Le challenge des années à venir, est de maîtriser le contexte dans lequel se trouve le récepteur, pour déterminer sa fonction, et ainsi modéliser ses nombreuses activités. Pour le moment, on ne peut maîtriser tous les éléments que constitue une cellule, un tissu ou un organe, et l'on essaye donc de comprendre les mécanismes de manière linéaire. L'émergence de nouvelles technologies permettra à l'avenir d'appréhender ces questions complexes et d'intégrer tous les signaux.

Ces travaux de biologie cellulaire et moléculaire permettent de décrypter de manière la plus précise possible les événements qui se déroulent dans la vie d'une cellule. Lesquels événements quand ils sont dérégulés vont mener à l'émergence de tumeurs. Ainsi, comprendre les mécanismes normaux de la signalisation, de l'activité et de la régulation d'une protéine cruciale est une première étape nécessaire à la recherche future d'éléments thérapeutiques qui cibleront spécifiquement la dérégulation dans son contexte cellulaire.

Annexes

Annexe 1:
**Inhibition of JNK by HGF/SF prevents apoptosis induced
by TNF- α .**

**Sylvie REVENEAU, Réjane PAUMELLE, Julien DEHEUNINCK, Catherine LEROY,
Yvan de LAUNOIT and Véronique FAFEUR.**

Ann. N.Y. Acad. Sci. 1010:100-103 (2003)

Inhibition of JNK by HGF/SF Prevents Apoptosis Induced by TNF- α

SYLVIE REVENEAU,^a RÉJANE PAUMELLE,^b JULIEN DEHEUNINCK,^b
CATHERINE LEROY,^b YVAN DE LAUNOIT,^b AND VÉRONIQUE FAFEUR^b

^a*Ecole Pratique des Hautes Etudes, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U517, BP 87900, 21079 Dijon, France*

^b*Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8117, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, B.P.447, 59021 Lille, France*

ABSTRACT: We investigated whether repression of JNK by hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) in MDCK epithelial cells is linked to its ability to protect cells from apoptosis. To this purpose, cells were treated by TNF- α , a well-known inducer of JNK and of cell death, and the effects of HGF/SF were investigated under these conditions. We identified repression of JNK as a signaling target of HGF/SF for protection against TNF- α -induced cell death. This effect of HGF/SF occurs via the activation of the PI3K and MEK1 pathways.

KEYWORDS: hepatocyte growth factor; scatter factor; JNK; tumor necrosis factor- α

Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is a mesenchymal-derived cytokine. It has multiple biological effects on epithelial cells, including induction of cell proliferation, migration, invasion, and morphogenesis. More recently, HGF/SF have been shown to induce cell survival, although some papers also reported a pro-apoptotic effect.^{1,2} The effects of HGF/SF are mediated by activation of its receptor, the proto-oncogene c-met, which bears an intrinsic kinase activity. Binding of HGF/SF causes dimerization and autophosphorylation of c-met, which in turn activates various signaling molecules, in particular PI3K and the MAPK ERK1/2.³ We previously found that HGF/SF can also induce weakly and then repress the activity of the MAPK JNK.⁴

It is known that JNK is primarily activated by various environmental stresses, including osmotic shock, UV radiation, heat shock, protein synthesis inhibitors, oxidative stress, and pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL1. In this study, we wished to investigate whether repression of JNK by HGF/SF in MDCK epithelial cells is linked to its ability to protect cells from apoptosis. To this purpose, cells were treated by TNF- α , a well-known inducer of JNK and of cell death and the effects of HGF/SF were investigated under these conditions.

Address for correspondence: Sylvie Reveneau, EPHE-INSERM U517, BP 87900, 21079 Dijon, France.
Sylvie.Reveneau@u-bourgogne.fr

Ann. N.Y. Acad. Sci. 1010: 100–103 (2003). © 2003 New York Academy of Sciences.
doi: 10.1196/annals.1299.016

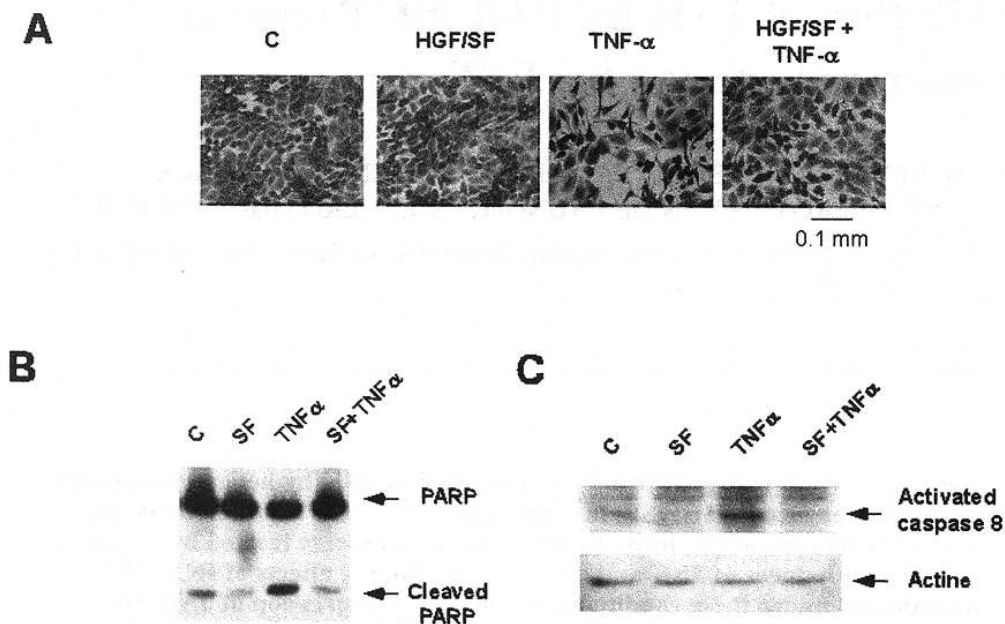


FIGURE 1. Effect of HGF/SF on TNF- α -induced cell death in MDCK cells. (A) Cells were incubated with HGF/SF (60 ng/mL) and/or TNF- α (30 ng/mL) in serum-free medium for 48 hours. (B and C) Cells were incubated in serum-free medium and treated by HGF/SF (30 ng/mL) and/or TNF- α (30 ng/mL) for 32 hours. Whole cell extracts were collected and cell extracts (30 μ g) were resolved on 10% SDS-PAGE. Immunoblots were performed using anti-PARP antibody (B) and anti-caspase 8 antibody and anti-actin (C) antibody, which indicate comparable loading. Full and cleaved form of PARP are indicated by arrows.

HGF/SF PREVENTS TNF- α -INDUCED CELL DEATH

As shown in FIGURE 1A, treatment of MDCK epithelial cells by HGF/SF prevented a decrease of cell viability by TNF- α . This decrease of cell viability by TNF- α corresponds to an increase in cell death, since TNF- α was found to induce DNA fragmentation, a conventional observation during the apoptotic process. In addition, this effect of TNF- α was caspase dependent, since it was prevented by Z-VAD-fmk, a pan-caspase inhibitor. Using this DNA fragmentation assay, we found that HGF/SF prevented apoptosis by TNF- α (data not shown). In agreement with these findings, HGF/SF also prevented other characteristics of TNF- α -induced cell death, such as activation of caspase-8 and cleavage of the poly-ADP-ribose polymerase (PARP), a substrate of caspase-3 (FIG. 1B and C).

HGF/SF INHIBITS TNF- α -INDUCED JNK PHOSPHORYLATION AND CELL DEATH VIA THE MEK1 AND PI3K PATHWAYS

We first established signaling pathways induced by TNF- α in MDCK cells (data not shown). TNF- α induced strongly JNK phosphorylation within 10 minutes and in a sustained manner, since it was still observed after 6 hours of treatment. TNF- α also

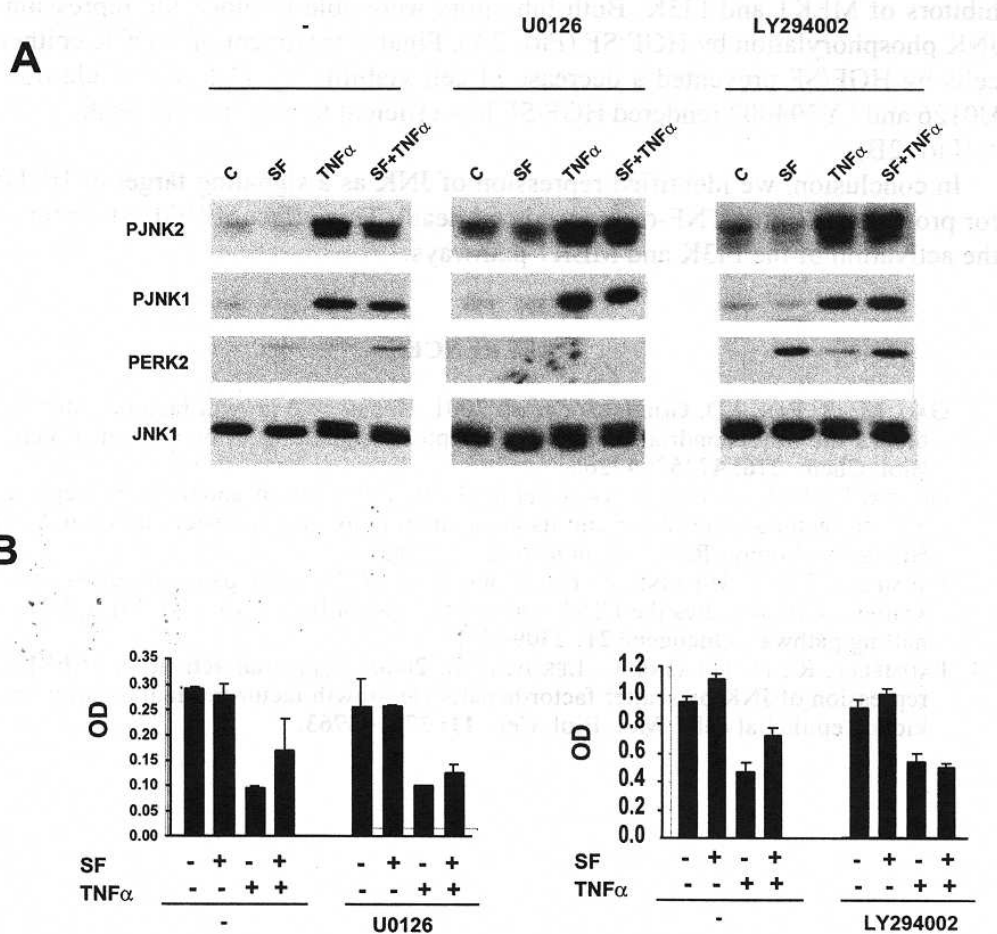


FIGURE 2. HGF/SF inhibits TNF- α -induced JNK phosphorylation via the MEKK1 and PI3K pathways. **(A)** Cells were incubated in serum-free medium (0.5%). The next day, cells were pretreated with U0126 (25 μ M) or LY294002 (25 μ M) for 30 minutes and then treated by HGF/SF (30 ng/mL) with or without TNF- α (30 ng/mL) for 8 hours. Phosphorylation and expression of JNK were determined by immunoblot analysis as described above. **(B)** Cells were incubated in serum-free medium and pretreated by U0126 (5 μ M) or LY294002 (25 μ M) inhibitors for 30 minutes and treated by HGF/SF (60 ng/mL) and/or TNF- α (30 ng/mL) for 24 hours. Cell viability was determined using a crystal violet colorimetric assay.

induced a transient degradation of I κ B within 10 minutes, in agreement with the known ability of TNF- α to induce NF κ B activation. In addition, TNF- α induced a weak phosphorylation of ERK and of AKT, a target of PI3K, within several minutes, which contrasts the strong induction of ERK and AKT by HGF/SF, which we previously reported.⁴

We then investigated whether these signaling targets of TNF- α were regulated by HGF/SF. As shown in FIGURE 2A, the induction of JNK phosphorylation by TNF- α was lowered when cells were pretreated by HGF/SF. In contrast, I κ B degradation induced after TNF- α stimulation was not altered by pretreatment by HGF/SF (data not shown). We then used U0126 and LY294002, which are, respectively, selective in-

hibitors of MEK1 and PI3K. Both inhibitors were able to block the repression of JNK phosphorylation by HGF/SF (FIG. 2A). Finally, treatment of MDCK epithelial cells by HGF/SF prevented a decrease of cell viability by TNF- α and addition of U0126 and LY294002 rendered HGF/SF less efficient to prevent cell death by TNF- α (FIG. 2B).

In conclusion, we identified repression of JNK as a signaling target of HGF/SF for protection against TNF- α -induced cell death. This effect of HGF/SF occurs via the activation of the PI3K and MEK1 pathways.

REFERENCES

1. GAO, M., S. FAN, I.D. GOLDBERG, *et al.* 2001. Hepatocyte growth factor/scatter factor blocks the mitochondrial pathway of apoptosis signalling in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 47257–47265.
2. GOHDA, E., H. OKAUCHI, M. IWAO, *et al.* 1998. Induction of apoptosis by hepatocyte growth factor/scatter factor and its augmentation by phorbol esters in Meth A cells. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **245**: 278–283.
3. PAUMELLE, R., D. TULASNE, Z. KHERROUCHE, *et al.* 2002. Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signalling pathway. *Oncogene* **21**: 2309–2319.
4. PAUMELLE, R., D. TULASNE, C. LEROY, *et al.* 2000. Sequential activation of ERK and repression of JNK by scatter factor/hepatocyte growth factor in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Mol. Biol. Cell.* **11**: 3751–3763.

Annexe 2:

HGF/SF regulates expression of apoptotic genes in MCF-10A human mammary epithelial cells.

Catherine LEROY, Julien DEHEUNINCK, Sylvie REVENEAU, Bénédicte FOVEAU, Zongling JI, Céline VILLENET, Sabine QUIEF, David TULASNE, Jean-Pierre KERCKAERT and Véronique FAFEUR.

Ann. N Y Acad. Sci. (2006)

HGF/SF regulates expression of apoptotic genes in MCF-10A human mammary epithelial cells

Catherine LEROY⁽¹⁾, Julien DEHEUNINCK⁽¹⁾, Sylvie REVENEAU⁽¹⁾, Bénédicte FOVEAU⁽¹⁾, Zongling Ji⁽¹⁾, Céline VILLENET⁽²⁾, Sabine QUIEF⁽²⁾, David TULASNE⁽¹⁾, Jean-Pierre KERCKAERT⁽²⁾ and Véronique FAFEUR⁽¹⁾.

(1) CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, B.P.447, 59021 Lille, FRANCE.

(2) Plate-forme Biopuces, Université de Lille 2, Faculté de Médecine, Place de Verdun, 59045, Lille, FRANCE

Correspondence should be addressed to :

Véronique FAFEUR

CNRS UMR 8161

Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille

B.P.447, 59021 Lille, FRANCE.

Tel : 33 3 20 87 10 91

Fax : 33 3 20 87 11 11

email : veronique.fafeur@ibl.fr

Running title : Target genes of HGF/SF

Keywords : HGF/SF, MET, apoptosis, target genes, breast, array.

ABSTRACT

Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) induces scattering, morphogenesis and survival of epithelial cells through activation of the MET tyrosine kinase receptor. HGF/SF and MET are involved in normal development and tumor progression of many tissues and organs, including the mammary gland. In order to find target genes of HGF/SF involved in its survival function, we used an oligonucleotide microarray representing 1920 genes known to be involved in apoptosis, transcriptional regulation and signal transduction. MCF-10A human mammary epithelial cells were grown in the absence of serum and treated or not with HGF/SF for 2 h. Total RNA was reverse transcribed to cDNA in the presence of fluorescent Cy3-dUTP or Cy5-dUTP to generate fluorescently labeled cDNA probes. Microarrays were performed and the ratios of Cy5/Cy3 fluorescence were determined. The expression of three apoptotic genes was modified by HGF/SF, with A20 being up-regulated, and DAXX and SMAC being down-regulated. These changes of expression were confirmed by real time quantitative PCR. According to current knowledge, A20 is anti-apoptotic, SMAC is pro-apoptotic, while a pro- or anti- apoptotic function of DAXX is controversial. The fact that HGF/SF up-regulates an anti-apoptotic gene (A20) and down-regulates a pro-apoptotic gene (SMAC) is in agreement with its survival effect in MCF-10A cells. This study identified novel apoptotic genes regulated by HGF/SF, which can contribute to its survival effect.

INTRODUCTION

Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) acts through the MET tyrosine kinase receptor to induce cell survival, growth, scattering and morphogenesis in various cell types. Both HGF/SF^{1, 2} and MET³ are essential for embryonic development. In the normal breast, HGF/SF is expressed primarily by stromal cells, while epithelial cells express MET but not HGF/SF, thus creating a paracrine mechanism where localized expression of HGF/SF regulates mammary ductal growth and differentiation^{4, 5}. In contrast to what occurs in normal epithelium, HGF/SF and MET are frequently overexpressed in invasive human breast carcinomas^{6, 7} as well as in many other cancer types⁸. This high level of HGF/SF expression has been described as an independent predictor of poor overall survival in patients with breast cancer⁹.

HGF/SF and MET are commonly described as anti-apoptotic molecules. HGF/SF or MET null mice display a severe reduction in the liver and show massive apoptosis¹⁻³. In cell culture, HGF/SF protects a number of cell types against cell toxicity and apoptosis caused by various stimuli, including DNA-damaging agents, serum withdrawal, and activation of death receptors¹⁰⁻¹³. Nonetheless, pro-apoptotic effects of HGF/SF were also reported in some sarcoma and carcinoma cell lines^{14, 15} and MET itself was found to be converted to a pro-apoptotic factor following its cleavage by caspases¹⁶.

The mechanisms for cell survival by HGF/SF have been explored. HGF/SF was found to inhibit several steps of the apoptotic mitochondrial pathway, including mitochondrial release of cytochrome c and of AIF (apoptosis-inducing factor), mitochondrial membrane depolarization and activation of several caspases in MDA-MB-453 mammary cells¹⁷. Accordingly, HGF/SF was found to regulate mitochondrial Bcl family members, both at transcriptional and postranscriptional levels. This includes inhibition by HGF/SF of the translocation of pro-apoptotic Bax from the cytosol to the mitochondrial membrane¹⁸, induction of phosphorylation of Bad, inactivating its pro-apoptotic function¹⁹, as well as induction of expression of anti-apoptotic molecules, such as Bcl-2²⁰ or Bcl-xL²¹. In addition, HGF/SF is known to protect cells from apoptosis through activation of both the PI3K-AKT and RAS-ERK pathways¹³. Their downstream actions may include phosphorylation of Bad for the PI3K-AKT pathway²¹ and dephosphorylation of the JNK kinase for the RAS-ERK pathway¹²

Overall, apoptotic genes regulated by HGF/SF are poorly known. In this study, we used an oligonucleotide array to identify novel apoptotic genes regulated by HGF/SF in human mammary cells.

MATERIALS AND METHODS

Cytokines, drugs and cell cultures. Human recombinant HGF/SF was purchased from Peprotech and anisomycin from Calbiochem. MDA-MB-231, human mammary adenocarcinoma cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen). MCF-7, human mammary adenocarcinoma cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 10 nM estradiol (Sigma). MCF-10A, human mammary epithelial cells, spontaneously immortalized, were cultured in DMEM and HAM's F12 (Invitrogen) (v/v) supplemented with 5% horse serum (HS, Invitrogen), 500 ng/ml hydrocortisone (Calbiochem), 20 ng/ml epidermal growth factor (Peprotech), 10 µg/ml insulin (Sigma), 100 ng/ml cholera toxin (Calbiochem).

Antibodies. Monoclonal antibody to E-Cadherin was purchased from Transduction Labs, polyclonal antibody to ER- α from Affinity Bioreagents and monoclonal antibody to Cytokeratin 18 from Oncogene. Monoclonal antibody to MET (DL-21), polyclonal antibody to Phospho MET (Tyr 1234/1235) and polyclonal antibody to GAB1 (CT) were purchased from Upstate Biotechnology. Monoclonal antibody to actin, polyclonal antibodies to PLC γ 1, ERK2 and AKT were purchased from Santa Cruz. Polyclonal antibody to Phospho-ERK (pTEpY) was purchased from Promega and polyclonal antibody to Phospho-AKT (Ser473) from Cell Signaling Technology.

Immunoblot. Cells were suspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH7.8, 50 mM NaCl, 5 mM EGTA, and 1% v/v Triton X-100) containing freshly added protease and phosphatase inhibitors (1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 1 µM leupeptin, 2 µM aprotinin, 20 mM β -glycerophosphate, and 1 mM sodium orthovanadate). Lysates were clarified by centrifugation at 4°C, and protein concentration was determined by Bio-Rad protein assay. Western-blotting was performed, as described previously²².

Cell scattering assay. Scattering from cell islets was performed as follows. Cells (5,000 cells / 24 well-plates) were grown in their respective culture medium. After 48 h, cells were incubated in DMEM-0.5 % FBS (MDA-MB-231 and MCF-7) or in DMEM/F12-0.5 % HS (MCF-10A) without supplements and in the presence or absence of HGF/SF (10 ng/ml) for 24 h. At the end of the experiment, cells

were fixed (methanol-0.02 g/l Fast Green) and stained using Carazzi / Eosine solutions. After examination by light microscopy, photographs were taken.

Survival assay. MCF-10A cells (200,000 cells / 6 well-plates) were grown for 24 h. Cells were then cultured in culture medium deprived of serum and supplements. Cells were then treated or not with anisomycin or HGF/SF. After few hours, when cell detachment was clearly observed, photographs were taken.

Semi quantitative RT-PCR. Total RNA was isolated using a RNeasy kit (Qiagen) and 1 µg of RNA was subjected to single-strand cDNA synthesis using Superscript II reverse transcriptase, oligo dT as a primer (Life Technologies) and a Perkin Elmer DNA thermal cycler. For each Polymerase Chain Reaction (PCR), 2.5 µl of cDNA was used for amplifications. The PCR primers sets and the optimal reaction conditions are shown in Table 2. PCR reaction conditions were individually optimized for each gene product. In particular, the cycle number was determined within the linear range of product amplification. The β actin gene was used as a control for loading. PCR products were analyzed by electrophoresis using 1% agarose gels and gels were photographed under ultraviolet illumination.

Quantitative RT-PCR. Total RNA was isolated as described above. To quantitatively estimate the mRNA expression of several genes, PCR amplification was performed on a Light-Cycler instrument system (Roche, Mannheim, Germany) using the Light- Cycler-FastStart DNA Master SYBR green I kit (Roche). The PCR primers sets and the optimal reaction conditions are shown in Table 3. To confirm the specificity of product, melt curves were generated over a 60°C-95°C range. A negative control, without cDNA, was run with each assay, and the β actin gene was used as an internal control. Relative copy number was calculated using the crossing threshold method, assuming an efficiency of 2 (relative copy number : $2^{-\Delta\Delta CT}$)²³.

Oligonucleotide Array. Total RNA was extracted using a RNeasy Minikit (Qiagen) and their quality was verified by an Agilent bioanalyzer. Total RNA was reverse-transcribed in the presence of Cy3-dUTP or of Cy5-dUTP. Microarray glass slides were prepared at the Microarray Platform of The Génopole de Lille-Université de Lille 2. Each slide was spotted with oligonucleotides (60 mers, Sigma

Genosys) sets corresponding to 1920 genes classified in apoptosis, signal transduction and transcriptional regulation. The labeled cDNAs were hybridized on microarray slides at 42°C using a Discovery Ventana robot and its optimized conditions of hybridation, washes and reagents. The slides were scanned using a GMS Confocal scanner (Affymetrix). The scanner output images were localized by overlaying a grid on the fluorescent images, using a Jaguar software (Screensaver). The fluorescent intensities were then calculated and normalized, using TIGR-MIDAS software. A final reported intensity corresponds to the difference between average probe intensity and average local background intensity. The ratios of the red intensity to the green intensity for all targets were determined and spots with ratio between -2 and +2 were eliminated.

RESULTS

Normal MCF-10A human mammary epithelial cells are responsive to HGF/SF

In order to perform target gene analysis in response to HGF/SF, we selected human mammary epithelial cells from available published data ^{24, 25}. We then choose to characterize responses to HGF/SF in two cell lines expressing the MET receptor : normal MCF-10A human mammary epithelial cells and tumorigenic MDA-MB-231 human mammary adenocarcinoma cells. The tumorigenic MCF-7 human mammary adenocarcinoma cells, which do not express MET, were chosen as a negative control.

Expression of various epithelial markers, including mammary epithelial markers, was checked in these cells (Fig. 1A). Cytokeratin-18, a marker of mammary epithelial cells, was expressed in the three cell lines. E-cadherin, a marker of epithelial junctions was expressed both by MCF-7 and MCF-10A cells, and, as expected, was not expressed by invasive MDA-MB-231 epithelial cells. The estrogen receptor was expressed only by MCF-7, as expected from estrogen responsive cells. Expression of the MET receptor was detected both in MDA-MB-231 and MCF-10A cells, and was weakly detected in MCF-7 cells. In addition, GAB1 and PLC γ , two known transducers of MET signaling, were expressed by the three cell lines. This profile of expression confirmed their mammary epithelial characteristic and potential sensitivity to HGF/SF of both MDA-MB-231 and MCF-10A cells.

We then investigated the response of these cells to HGF/SF. In MDA-MB-231 and MCF-10A cells, but not in MCF-7 cells, HGF/SF induced phosphorylation of MET, showing that HGF/SF can activate this receptor in either MDA-MB-231 or MCF-10A cells (Fig. 1B). An efficient cell scattering response to HGF/SF was only observed in MCF-10A (Fig. 1C). Indeed, the constitutive scattering of MDA-MB-231 cells, could not be further induced by HGF/SF, even though HGF/SF was able to induce MET phosphorylation. HGF/SF did not induce cell scattering in MCF-7 cells, in agreement with the low expression (or to the absence of inducible phosphorylation) of MET. We further checked whether MCF-10A cells are sensitive to a survival effect of HGF/SF (Fig. 1D). When cells were treated with anisomycin, a well known inducer of apoptosis, HGF/SF was found to protect these cells from massive detachment.

These data show that HGF/SF induces MET signaling, scattering and survival in normal MCF-10A human mammary epithelial cells.

HGF/SF regulates expression of apoptotic genes

MCF-10A cells were grown for one day in the absence of serum and then treated or not with HGF/SF for 2 h. Total RNA was reverse-transcribed in the presence of Cy3-dUTP or Cy5-dUTP. The fluorescently labeled cDNA probes were then hybridized on an oligonucleotide microarray representing 1920 genes, classified in apoptosis, signal transduction and transcriptional regulation. The slides were scanned and fluorescent intensities were then calculated and normalized. The ratios of the red intensity to the green intensity for all targets were determined and spots with ratio between -2 and +2 were eliminated.

As shown in Table 1, 38 genes among the 1920 genes were differently expressed in response to HGF/SF, with 14 induced- and 24 repressed- genes. According to their initial classification in the microarray and following analysis of the available literature for these 38 genes, we found that three genes, A20, SMAC and DAXX, were clearly involved in apoptosis. Their differential expressions were confirmed using both semi-quantitative and quantitative PCR from an independent experiment (Fig 2). These results show that HGF/SF induced expression of gene A20 and repressed expression of SMAC and DAXX genes.

DISCUSSION

We identified three novel apoptotic genes regulated by HGF/SF in MCF10-A normal human mammary epithelial cells. Indeed, our data demonstrated that HGF/SF induces expression of A20 and represses expression of both SMAC and DAXX. Although these three genes are classified as apoptotic genes, their function in apoptosis is quite distinct.

A20/TNFAIP3 (tumor necrosis factor-induced protein 3) was initially identified as an early response gene of TNF α in endothelial cells²⁶ and as an inhibitor of TNF α -induced apoptosis²⁷. The A20 gene encodes a cytoplasmic zing finger protein of 90 kDa, which can interact with numerous proteins of TNF α signaling pathways, including TRAF2, TRAF6, ABIN and IKK γ / NEMO (see²⁸). In agreement with these studies, A20-deficient mice are more susceptible to TNF α stimulated apoptotic cell death, develop severe inflammation and cachexia, and die prematurely²⁹. Apart from TNF α -induced cell death, A20 was found to inhibit cell death in a number of other systems, including inhibiting apoptosis induced by serum depletion or by overexpression of p53 (see²⁸). A20 is also known to function as a potent inhibitor of NF κ B-dependent gene expression. Indeed, A20 expression is regulated by NF- κ B and can block activation of NF κ B through a negative-feedback loop³⁰. A similar negative regulation has been shown for I κ B, a well known inhibitor of NF κ B³¹. Taken together, these findings support a role of A20 in promoting cell survival against various apoptotic stimuli, as well as in terminating NF κ B-dependent gene expression.

SMAC/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase-3 / direct IAP-binding protein with low pI) was initially purified from subcellular extracts containing high caspase-3 activity³². This 25 kDa protein is now known to promote apoptosis by eliminating the functions of IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) (see³³). Indeed, in response to apoptotic stimuli, the mitochondrial SMAC is released into the cytosol, binds to IAPs and prevents them from sequestering caspases^{32, 34, 35}. Inhibition of IAPs functions by SMAC was also found to potentiate TRAIL-induced apoptosis, a death receptor ligand, indicating that SMAC also plays a role in death receptor signaling³⁶. It thus appears that Smac/DIABLO can contribute both to the mitochondrial pathway and to the death receptor pathway of apoptosis.

In contrast to A20 and SMAC, the function of DAXX in promoting apoptosis or survival is more controversial (see³⁷). DAXX (Death-associated protein 6) was originally identified as a cytoplasmic protein that specifically binds to the death domain of the FAS death receptor (also called CD95) and

potentiates FAS-induced apoptosis³⁸. In the cytoplasm, this protein of about 120 kDa interacts and activates the pro-apoptotic ASK1 protein³⁹ and activates JNK, which regulates stress-induced cell death⁴⁰. However, a large proportion of DAXX molecules are nuclear and associate with subnuclear domains. In the nucleus, DAXX represses several transcription factors, including PAX3 and ETS1, and interacts with crucial proteins involved in transcriptional silencing, including histone deacetylase II⁴¹, providing a potential mechanism by which DAXX can repress transcription. Nonetheless, it is still unclear whether the pro-apoptotic function of DAXX is dependent on its transcriptional functions. Despite these reports advocating a pro-apoptotic function for DAXX, several studies have suggested a potential anti-apoptotic function of DAXX. Disruption of the DAXX gene in mice results in early embryonic lethality, with extensive apoptosis, showing that DAXX is essential for early development⁴². An anti-apoptotic role for DAXX was evidenced from DAXX RNAi experiments, which show sensitization of cells to apoptosis induced by FAS, UV or TNF α ^{43,44}.

This overview of the actual knowledge leads to the proposal that A20 is anti-apoptotic, SMAC is pro-apoptotic, while a pro- or anti- apoptotic function of DAXX is still controversial. The fact that HGF/SF induces A20 and represses SMAC expression is therefore in agreement with HGF/SF induces cell survival. A synthetic view of the known survival mechanisms of HGF/SF and of the main implications of A20, SMAC and DAXX in apoptosis pathways is shown in figure 3. Our study did not evaluate the possible contribution of A20, SMAC and DAXX in survival signaling pathways of HGF/SF. Functional analysis of these genes by overexpression or downregulation could resolve this issue.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNRS, Pasteur Institute of Lille, USTL (Université des Sciences et Technologies de Lille) and INSERM, and by grants from Fondation de France, Ligue Régionale contre le Cancer- Comité Nord and Région Nord-Pas de Calais - FEDER. The Microarray Platform of The Génopole de Lille-Université de Lille 2 was supported by "Région Nord-Pas de Calais et Picardie". JD was supported by fellowship from ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer) and ZJ by a fellowship from Fondation de France.

REFERENCES

1. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995;373:699-702.
2. Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, Kitamura N. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 1995;373:702-5.
3. 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.
4. Andermarcher E, Surani MA, Gherardi E. Co-expression of the HGF/SF and c-met genes during early mouse embryogenesis precedes reciprocal expression in adjacent tissues during organogenesis. *Dev Genet* 1996;18:254-66.
5. Niemann C, Brinkmann V, Spitzer E, Hartmann G, Sachs M, Naundorf H, Birchmeier W. Reconstitution of mammary gland development in vitro: requirement of c-met and c-erbB2 signaling for branching and alveolar morphogenesis. *J Cell Biol* 1998;143:533-45.
6. 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.
7. Wang Y, Selden AC, Morgan N, Stamp GW, Hodgson HJ. Hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human mammary epithelium. *Am J Pathol* 1994;144:675-82.
8. Jiang WG, Martin TA, Parr C, Davies G, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;53:35-69.
9. Yamashita J, Ogawa M, Yamashita S, Nomura K, Kuramoto M, Saishoji T, Shin S. Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. *Cancer Res* 1994;54:1630-3.
10. Bowers DC, Fan S, Walter KA, Abounader R, Williams JA, Rosen EM, Lattera J. Scatter factor/hepatocyte growth factor protects against cytotoxic death in human glioblastoma via phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT- dependent pathways. *Cancer Res* 2000;60:4277-83.
11. Kosai K, Matsumoto K, Nagata S, Tsujimoto Y, Nakamura T. Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:683-90.

12. Reveneau S, Paumelle R, Deheuninck J, Leroy C, De Launoit Y, Fafeur V. Inhibition of JNK by HGF/SF prevents apoptosis induced by TNF-alpha. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:100-3.
13. Xiao GH, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsuuchi Y, Vande Woude GF, Testa JR. Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:247-52.
14. Arakaki N, Kazi JA, Kazihara T, Ohnishi T, Daikuhara Y. Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the apoptosis signaling pathway by increasing caspase-3 activity in sarcoma 180 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245:211-5.
15. Tajima H, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor has potent anti-proliferative activity in various tumor cell lines. *FEBS Lett* 1991;291:229-32.
16. Tulasne D, Deheuninck J, Lourenco FC, Lamballe F, Ji Z, Leroy C, Puchois E, Moumen A, Maina F, Mehlen P, Fafeur V. Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. *Mol Cell Biol* 2004;24:10328-39.
17. Gao M, Fan S, Goldberg ID, Latterra J, Kitsis RN, Rosen EM. Hepatocyte growth factor/scatter factor blocks the mitochondrial pathway of apoptosis signaling in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2001;276:47257-65.
18. Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Taniyama Y, Aoki M, Yamasaki K, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. Hepatocyte growth factor prevents endothelial cell death through inhibition of bax translocation from cytosol to mitochondrial membrane. *Diabetes* 2002;51:2604-11.
19. Liu Y, Sun AM, Dworkin LD. Hepatocyte growth factor protects renal epithelial cells from apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:821-6.
20. Yamamoto K, Morishita R, Hayashi S, Matsushita H, Nakagami H, Moriguchi A, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. Contribution of Bcl-2, but not Bcl-xL and Bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells. *Hypertension* 2001;37:1341-8.
21. Liu Y, Tolbert EM, Lin L, Thursby MA, Sun AM, Nakamura T, Dworkin LD. Up-regulation of hepatocyte growth factor receptor: an amplification and targeting mechanism for hepatocyte growth factor action in acute renal failure. *Kidney Int* 1999;55:442-53.

22. Paumelle R, Tulasne D, Kherrouche Z, Plaza S, Leroy C, Reveneau S, Vandebunder B, Fafeur V, Tulashe D. Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene* 2002;21:2309-19.
23. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001;25:402-8.
24. Montesano R, Soriano JV, Malinda KM, Ponce ML, Bafico A, Kleinman HK, Bottaro DP, Aaronson SA. Differential effects of hepatocyte growth factor isoforms on epithelial and endothelial tubulogenesis. *Cell Growth Differ* 1998;9:355-65.
25. Parr C, Jiang WG. Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor, its activator, inhibitors and the c-Met receptor in human cancer cells. *Int J Oncol* 2001;19:857-63.
26. Opipari AW, Jr., Boguski MS, Dixit VM. The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. *J Biol Chem* 1990;265:14705-8.
27. Opipari AW, Jr., Hu HM, Yabkowitz R, Dixit VM. The A20 zinc finger protein protects cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *J Biol Chem* 1992;267:12424-7.
28. Beyaert R, Heyninck K, Van Huffel S. A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappa B-dependent gene expression and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1143-51.
29. Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, Ma A. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 2000;289:2350-4.
30. Krikos A, Laherty CD, Dixit VM. Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem* 1992;267:17971-6.
31. Arenzana-Seisdedos F, Thompson J, Rodriguez MS, Bachelier F, Thomas D, Hay RT. Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 1995;15:2689-96.
32. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42.
33. Verhagen AM, Vaux DL. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis* 2002;7:163-6.

34. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000;102:43-53.
35. Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 2000;406:855-62.
36. Deng Y, Lin Y, Wu X. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev* 2002;16:33-45.
37. Salomoni P, Khelifi AF. Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol* 2006.
38. Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 1997;89:1067-76.
39. Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H, Baltimore D. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 1998;281:1860-3.
40. Khelifi AF, D'Alcontres MS, Salomoni P. Daxx is required for stress-induced cell death and JNK activation. *Cell Death Differ* 2005;12:724-33.
41. Hollenbach AD, McPherson CJ, Mientjes EJ, Iyengar R, Grosveld G. Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *J Cell Sci* 2002;115:3319-30.
42. Michaelson JS, Bader D, Kuo F, Kozak C, Leder P. Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes Dev* 1999;13:1918-23.
43. Chen LY, Chen JD. Daxx silencing sensitizes cells to multiple apoptotic pathways. *Mol Cell Biol* 2003;23:7108-21.
44. Michaelson JS, Leder P. RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX. *J Cell Sci* 2003;116:345-52.

Table 1. Results of the oligonucleotide array analysis. List of the 38 genes regulated by HGF/SF in MCF-10A cells (-: repressed, + : induced). Name, gene name and Unigene ID are indicated.

Ratio	Name	Gene name	UniGene ID
-	<i>cd38</i>	CD38 antigen (p45)	Hs.66052
	<i>chl1/call</i>	Cell adhesion molecule L1-like	Hs.210863
	<i>daxx</i>	Death-associated protein 6	Hs.336916
	<i>dfcp1/taff1</i>	Double FYVE-containing protein 1	Hs.20047
	<i>dctn2</i>	Dynactin 2	Hs.84153
	<i>etv1/er81</i>	ETS variant gene 1	Hs.89566
	<i>foxh1/fast1</i>	Forkhead box H1	Hs.159251
	<i>gnrh1/lnrh</i>	Gonadotropin-releasing hormone 1 / luteinizing-releasing hormone	Hs.82963
	<i>hos1/T-box 5</i>	Holt-Oram syndrome protein	Hs.50947
	<i>iqgap2</i>	IQ motif-containing GTPase-activating protein 2	Hs.78993
	<i>lta/tnfB</i>	Lymphotoxin-alpha	Hs.36
	<i>mknk1/mnk1</i>	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 1	Hs.5591
	<i>map2k3/mek3</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	Hs.180533
	<i>myt-1</i>	Myelin transcription factor 1-like	Hs.172619
	<i>nurr/nr4a2</i>	Nuclear receptor-related 1	Hs.82120
	<i>pitpnc1/rdgbb</i>	Phosphatidylinositol transfer protein cytoplasmic 1 / Retinal degeneration B beta gene	Hs.333212
	<i>pkd2l2</i>	Polycystic kidney disease 2-like 2 gene	Hs.272418
	<i>ppp1r7</i>	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 7	Hs.36587
	<i>ranbp8/ipo8</i>	Ran-binding protein 8	Hs.119687
	<i>smac/diablo</i>	Second mitochondria-derived activator of caspase	Hs.169611
<i>sptb</i>	Spectrin beta	Hs.47431	
<i>sycp2</i>	Synaptonemal complex protein 2	Hs.202676	
<i>tf-1</i>	Thyroid transcription factor-1	Hs.79531	
<i>relB</i>	v-REL avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	Hs.858	
+	<i>ebf</i>	Early B-cell factor	Hs.185708
	<i>egr3</i>	Early growth response 3 gene	Hs.74088
	<i>edar</i>	Ectodysplasin 1, anhidrotic receptor	Hs.58346
	<i>flt3lg</i>	Ligand of fms-related tyrosine kinase 3	Hs.428
	<i>il2rg/cd132</i>	Interleukin 2 receptor, gamma	Hs.84
	<i>krt9/k9</i>	Keratin 9	Hs.2783
	<i>nrip1/rip140</i>	Nuclear receptor-interacting protein 1	Hs.155017
	<i>pik3cb/p110-beta</i>	Phosphoinositide 3-kinase, catalytic, beta	Hs.239818
	<i>pmch</i>	Pro-melanin-concentrating hormone	Hs.2182
	<i>rpl6</i>	Ribosomal protein L6	Hs.174131
	<i>smarca2/snf212</i>	SW1/SNF related, matrix associated, actin-dependent regulator of chromatin	Hs.198296
	<i>tbr1</i>	T-brain-1 protein	Hs.210862
	<i>tsc22</i>	Transforming growth factor beta-stimulated gene	Hs.114360
<i>tnfaip3/A20</i>	Tumor necrosis factor-alpha-induced protein 3	Hs.211600	

Table 2 : PCR reaction conditions for semiquantitative RT-PCR assays.

Gene name	Primer sequences	Size PCR product (bp)	Annealing temperature (°C)	MgCl ₂ (mM)	Cycle numbers
<i>A20</i>	sens : CGGCTGCGTGTATTTTGGGACTC antisens : TCTTCGGGGGCAGGCTCACC	438	60.4	2	33
<i>β actin</i>	sens : CGGTGACGGGGTCACCCACA antisens : AAGCATTTGCGGTGGACGAT	660	55	2,5	30
<i>daxx</i>	sens : CGGCGGCTGCAGGAAAAGGAGT antisens : GCGCCGGGCCAACACAGGA	474	62.3	2	36
<i>smac</i>	sens : CACTGCCCTGTCTCCCCACTCA antisens : CCCTCCCCCTGCCACAACACTG	418	57.5	2	33

Table 3 : PCR reaction conditions for quantitative RT-PCR assays.

Gene name	Primer sequences	Size PCR product (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>A20</i>	sens : CTTCTCAGTACATGTGGGGCGTTCAGG antisens : CCCATTCATCATTCCAGTTCCGAGTATCAT	183	72
<i>β actin</i>	sens : CGGTGACGGGGTCACCCACA antisens : CGCGGTTGGCCTTGGGGTTCAG	260	72
<i>daxx</i>	sens : GGACCCACAAATGCTGAAAACACTGC antisens : AGGGGATGCGCTGCTCTATGACACG	278	74
<i>smac</i>	sens : AATGATTTAGTACTTGTTCCCTCTGTTGG antisens : GGCCTGTGTTAAGTCCTGTTGATGT	240	65

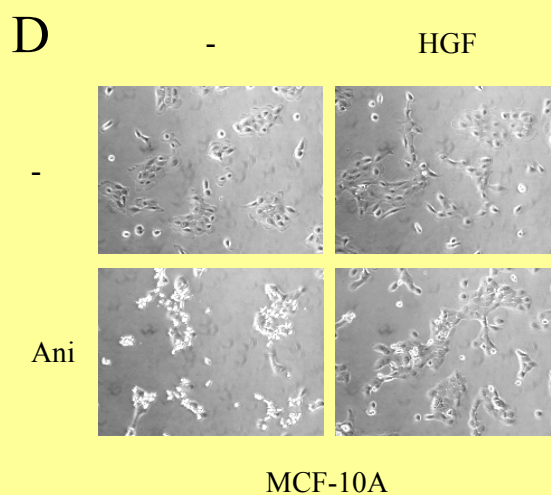
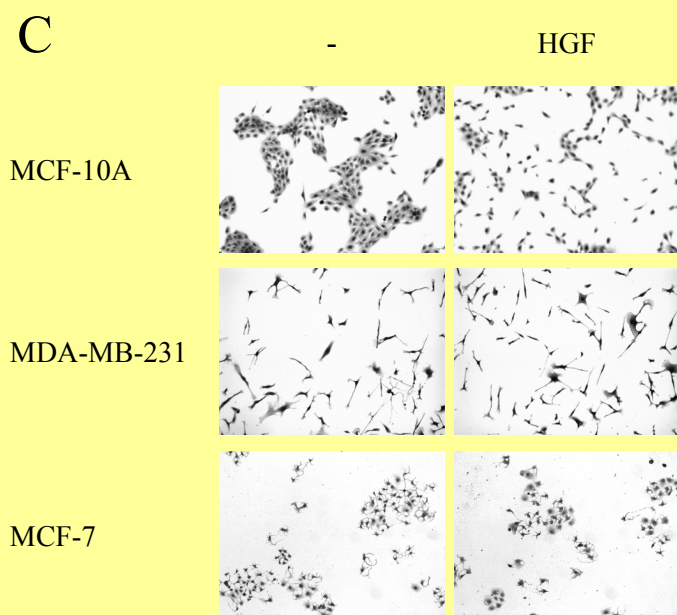
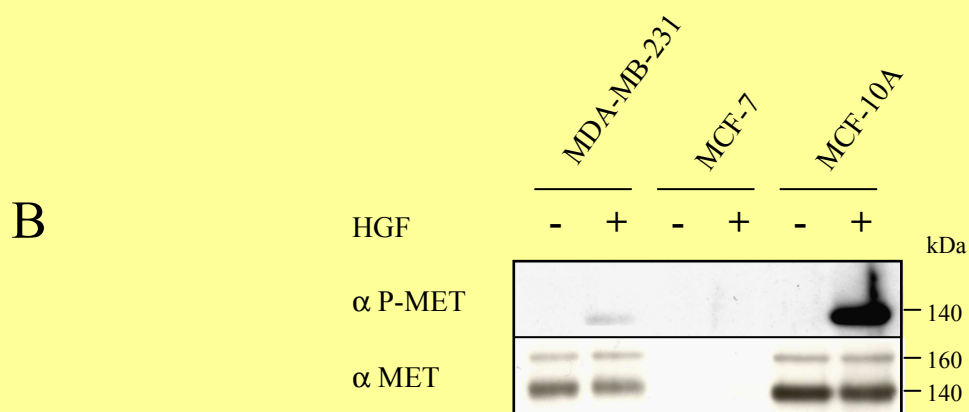
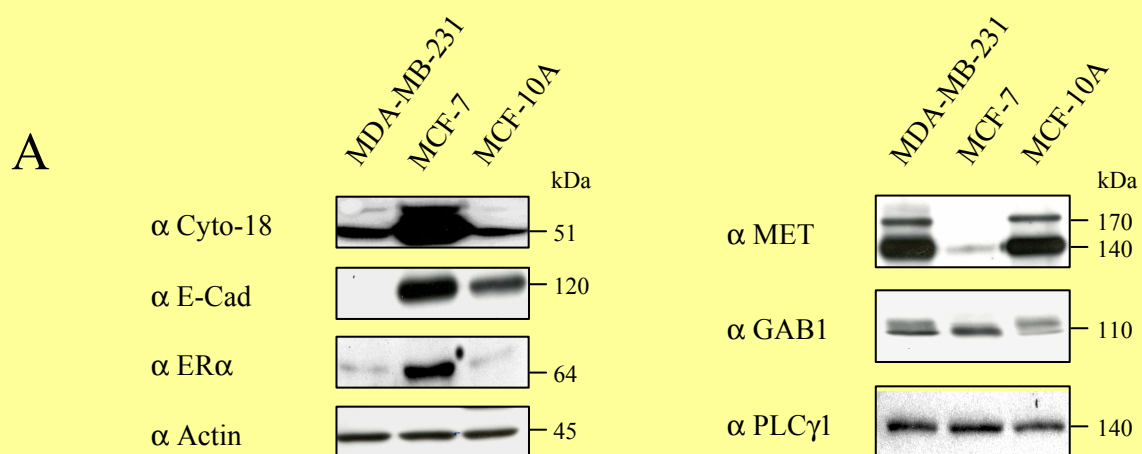
LEGENDS

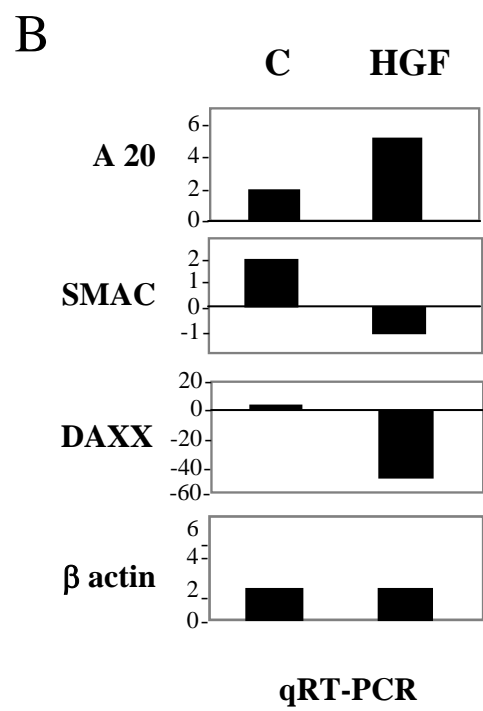
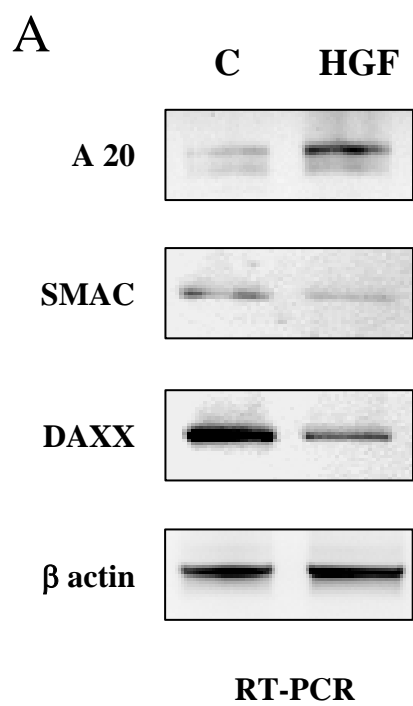
Figure 1. (A). Detection of various epithelial markers (left panel), and of HGF/SF signaling proteins (right panel) in MDA-MB-231, MCF-7 and MCF-10A cells. Protein extracts (20 μ g) were immunoblotted using specific antibody (antibodies : α : Cadherin E : E-Cad, estrogen receptor α : ER α , cytokeratin 18 : Cyto-18, MET, GAB1, Actin, phospholipaseC- γ 1 : PLC γ 1). (B). Effect of HGF/SF on MET phosphorylation. Cells were treated by HGF/SF (30 ng/ml) for 30 min. Protein extracts (20 μ g) were immunoblotted using an anti-phospho-MET antibody. The filter was stripped and reprobed using an anti-MET antibody. (C). Cells were treated for 24 h by HGF/SF (10 ng/ml) to induce cell scattering. After fixation and staining, photographs were taken. (D) Serum-deprived MCF-10A cells were treated with or without HGF/SF (10 ng/ml) and anisomycin (50 μ M) for few hours. When massive cell detachment by anisomycin was observed, photographs were taken.

Figure 2. Serum-deprived MCF-10A cells, were treated or not with HGF/SF (10 ng/ml) for 2 h. mRNA expression of A20, SMAC and DAXX genes were verified by semi-quantitative RT-PCR (A) and by real-time quantitative RT-PCR (B).

Figure 3. Schematic representation of survival mechanisms induced by HGF/SF. The central panel points to the novel target genes (A20, SMAC and DAXX) of HGF/SF identified in this study and their induced or repressed expression by HGF/SF is indicated by an arrow. The implication of A20, SMAC, DAXX in apoptosis pathways are indicated (see text for details).

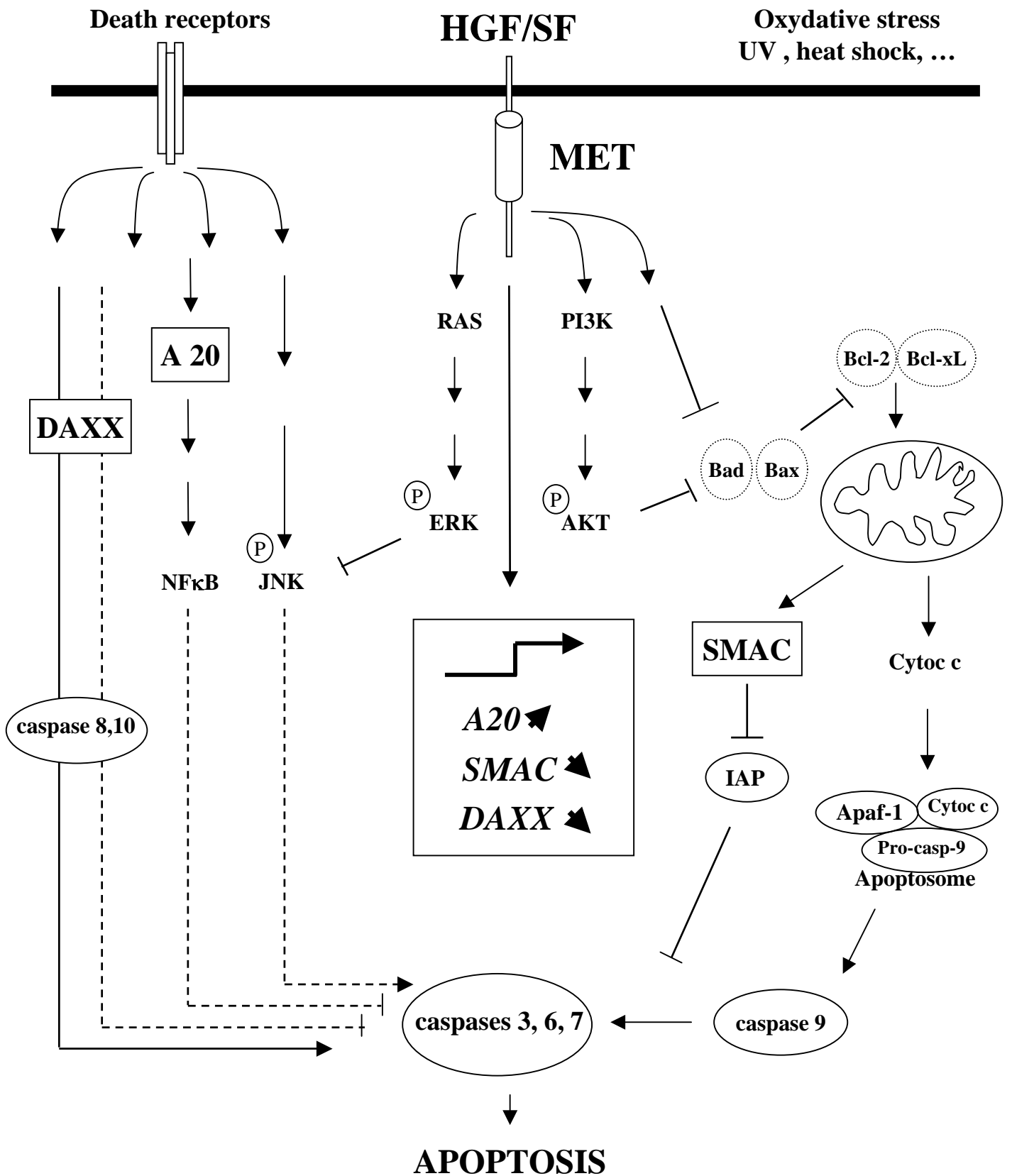
Fig.1





Death receptor pathway

Mitochondrial pathway



Annexe 3:

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

Bénédicte FOVEAU, Catherine LEROY, Frédéric ANCOT, Julien DEHEUNINCK,

Zongling JI, Véronique FAFEUR and David TULASNE.

En révision à Cell Death and differentiation.

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

Bénédicte FOVEAU*, Catherine LEROY*, Frédéric ANCOT, Julien DEHEUNINCK, Zongling JI, Véronique FAFEUR and David TULASNE.

CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, CNRS-Institut Pasteur de Lille-Université de Lille 1-Université de Lille 2, IFR142, B.P.447, 59021 Lille cedex, FRANCE.

*These authors contributed equally to the study

Correspondence should be addressed to:

David TULASNE

CNRS UMR 8161

Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille

B.P.447, 59021 Lille, FRANCE.

Tel: 00 33 3 20 87 10 91

Fax: 00 33 3 20 87 11 11

email: david.tulasne@ibl.fr

Running title: Sequential caspase cleavages of MET

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

Abstract

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

INTRODUCTION

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

The ligand activated-MET stimulates proliferation, scattering, invasion and morphogenesis of epithelial cells, acts as an angiogenic factor in endothelial cells and has chemoattractant and neurotrophic activities in different types of neurons. HGF/SF is also a survival factor, which protects a number of cell types against cell toxicity and apoptosis caused by various stimuli, including DNA-damaging agents, serum withdrawal or activation of death receptors (13-15). Phenotypic analysis of *hgf* or *met* null mice have shown that HGF/SF-MET signaling is essential for hepatocyte survival, since these mice display a severe size reduction of the liver and show massive apoptosis (16-18).

Although the HGF/SF-MET system is involved in cell survival, we recently reported that MET is a functional target of caspases (19). Indeed, we have shown that stress stimuli induce the caspase cleavage of MET in physiological cellular targets. Cleavage occurs at aspartic residue 1000 within the ESVD motif of the juxtamembrane region of mouse MET. This cleavage generates an intracellular 40 kDa MET fragment containing the kinase domain. The p40 MET fragment itself causes apoptosis, whereas its kinase dead version is impaired in pro-apoptotic activity. Stress stimuli are therefore able to convert the MET survival receptor into a pro-apoptotic factor.

Activation of caspases during apoptosis results in proteolytic cleavage of a variety of substrates, which may directly contribute to the apoptotic process. These cleavages can have opposite consequences on substrates. In most cases, the cleavage inactivates the targeted substrate (see (20)). For instance, ICAD (the inhibitor of caspase-activated DNase) is inactivated by caspase-3 cleavage, which allows activation of the CAD endonuclease and

DNA fragmentation characteristic of apoptosis (21, 22). Nonetheless, in some cases, caspase cleavage was found to activate the targeted substrate. For instance, the serine/threonine kinase ROCK1 is cleaved by caspases, which increases its kinase activity by removing a regulatory domain (23, 24). Activated ROCK1, through phosphorylation of the myosin light chain, is involved in membrane blebbing, characteristic of apoptosis. The caspase cleavage in the juxtamembrane domain of MET leads to the generation of a pro-apoptotic factor, whereas the ligand activated-receptor induces survival. Thus, in the case of MET, caspase cleavage induces an original conversion from a survival receptor to a pro-apoptotic factor. The mechanisms of this conversion through caspase cleavage were unknown. We show here that in addition to the juxtamembrane cleavage, the MET tyrosine kinase is cleaved by caspases within its C-terminal extremity. By characterizing this cleavage site, we found that this additional cleavage is essential for triggering pro-apoptotic activity of the p40 MET fragment.

RESULTS

Stress induces both juxtamembrane and C-terminal cleavages of MET

TRK-MET receptors are known to mediate MET-specific signals in epithelial cells in response to NGF and have been useful in unravelling intracellular MET signaling (25, 26). These chimeras consist of the extracellular portion of the human TRK-A receptor coupled to the transmembrane and intracellular domains. In order to facilitate its detection, we tagged TRK-MET chimeras with C-terminal V5 epitope.

The TRK-MET V5 expression plasmid was stably transfected in MDCK epithelial cells. The chimeric TRK-MET receptor was detected at the expected size using an anti-murine MET antibody, which does not detect endogenous canine MET (Figures 1A and B, left panel). TRK-MET detection was similarly obtained using an anti-V5 antibody (Figures 1A and B, right panel). Treatment of these cells with the apoptotic inducer anisomycin causes within several hours a massive cell detachment and activation of caspase-3. These effects correlated, as previously shown, with generation of the p40 MET fragment, detected with the anti-MET antibody (Figure 1A). This fragment is generated through caspase cleavage at aspartic acid 1000 of the juxtamembrane region and displays intrinsic pro-apoptotic activity (19).

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

Although these data were expected, the V5 antibody was not able to detect the generated p40 MET (Figures 1A and B) suggesting that the C-terminal tag was lost by cleavage during the apoptotic process. This led us to examine further the possible existence of a caspase dependent cleavage of MET in this C-terminal region.

C-terminal cleavage occurs at aspartic acid 1374 within the extreme C-terminal tail

Since mouse MET contains a putative caspase site (DNID₁₃₇₄) located 5 amino acids upstream of the stop codon, we investigated whether a caspase cleavage could occur at this site (Figure 1C). Experiments were performed using MDCK cells stably expressing TRK-MET chimeric receptors, in which aspartic acid was replaced or not by asparagine in the

juxtamembrane (D1000N) and C-terminal (D1374N) regions (Figure 1C). Cell extracts were incubated with purified active caspase-3 and the TRK-MET receptors detected using either anti-MET or anti-V5 antibodies. Incubation of TRK-MET WT with caspase-3 allowed generation of p40 MET detected with the anti-MET antibody (Figure 1D, left panel). In contrast, p40 MET and full length MET receptor were not detected using the anti-V5 antibody, demonstrating the C-terminal cleavage (Figure 1D, right panel). As expected, from TRK-MET D1000N expressing cells, p40 MET was not generated, while the C-terminal cleavage was still effective since V5 detection was lost. From TRK-MET D1374N, p40 MET was still generated and was detected with the anti-V5 antibody (Figure 1D). The size of the p40 MET fragment generated was slightly increased, in agreement with the presence of the V5 tag. From TRK-MET mutated on both sites, p40 MET generation was abolished and V5 detection of TRK-MET conserved. These results demonstrate that aspartic acid D1374 is required for *in vitro* C-terminal cleavage by caspase-3. Similarly to the TRK-MET D1374N mutant, the mutation D1371N resulted in abolition of the C-terminal cleavage, indicating that the DNID sequence is the C-terminal caspase target motif (data not shown).

Mutation of the C-terminal caspase site prevents juxtamembrane cleavage

Using *in vitro* cleavage with purified caspase-3, we identified the aspartic acid 1374 as the site of the C-terminal cleavage of MET (Figure 1D). We next evaluated the consequence of mutating the C-terminal caspase site on the fate of the MET receptor subjected to stress induced endogenous activation of caspases. MDCK cells were transiently transfected with TRK-MET chimeras, and cell extracts were analyzed by western blot using either anti-MET or anti-V5 antibody. In cells transfected with TRK-MET WT, the p40 MET fragment was detected, as well as the full length receptor (Figure 2A). We noticed that stress induced by transient transfection was sufficient to induce its cleavage, **which was inhibited by pan caspase inhibitor zVAD (Supplementary data, Figure S1), suggesting involvement of activated caspases in this process.** In this condition, p40 MET was detected as a doublet with the upper band corresponding to phosphorylated p40 MET, as previously described (19). In cells transfected with TRK-MET D1000N, p40 MET was not observed, as expected.

Importantly, in cells transfected with TRK-MET D1374N detection of p40 MET using an anti-MET antibody was strongly decreased in comparison to TRK-MET WT (Figure 2B, left panel, lane 2 and 4). The reprobe with V5 antibody shows that the remaining p40 MET generated by TRK-MET D1374N is still V5 tagged (Figure 2A, right panel, lane 4). Therefore, the fact that p40 MET is more efficiently generated from WT compared to

D1374N mutant, indicates that mutation of the C-terminal caspase site prevents cleavage within the juxtamembrane region.

To investigate further this result, apoptosis was induced in stably transfected MDCK cells, which express comparable levels of the different TRK-MET chimeras. As shown in figure 2B, following pro-apoptotic stimuli, p40 MET was generated from TRK-MET WT but not from TRK-MET D1000N. MDCK cells expressing TRK-MET with the D1000N mutation were constitutively scattered (Supplementary data, Figure S2). This phenotype was previously described as a consequence of the loss of Cbl association, which impairs its contribution to down regulation of the MET receptor (27). These cells displayed also lower activation of caspase-3 following anisomycin treatment (Figure 2B) and lower cell death measured by trypan blue exclusion following anisomycin or TNF α /cycloheximide treatment (Figure 2C). This indicates that cells expressing TRK-MET with D1000N mutation were more resistant to apoptosis, which could be a consequence of the deregulation of the receptor.

Importantly, in cells expressing TRK-MET D1374N, generation of p40 MET was strongly decreased (Figure 2B, left panel, lane 2 and 6). Similar results were obtained in time course experiments following treatment with various apoptotic inducers including anisomycin, TNF α /cycloheximide and staurosporine (Figure 3).

Together, our results show that mutation of the C-terminal caspase site unfavors juxtamembrane cleavage and then p40 MET generation, revealing the sequential organisation of the MET cleavages. This suggests a cross-talk between the C-terminal and the juxtamembrane cleavages, with the C-terminal favoring the juxtamembrane one. It is worth noting that sequential cleavages of MET are visualized only in cells following stress induction. In fact, during *in vitro* cleavage using purified caspases, mutation of the C-terminal site did not inhibit juxtamembrane cleavage, a likely consequence of efficient *in vitro* cleavage by excess of purified caspase.

Cleavage of MET receptor by caspase-3

To compare the ability of various caspases to cleave MET, cell extracts from MDCK cells expressing TRK-MET V5 were incubated with purified caspases. Among them only caspase-3 was able to generate p40 MET (Figure 4A, left panel). In addition, in extracts treated with caspase-3, neither p40 MET nor TRK-MET were detected using the anti-V5 antibody (Figure 4A, right panel). These results indicate that MET is an *in vitro* substrate of caspase-3, with cleavage occurring both at the juxtamembrane and C-terminal regions.

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

Juxtamembrane and C-terminal cleavages of the human MET receptor

The juxtamembrane caspase motif (ESVD) and the surrounding amino acids are highly conserved upon species. In contrast, the C-terminal tail of MET containing the additional caspase site is poorly conserved (Figure 5A). In zebra fish and xenopus, a potential caspase motif was not found, while in chicken, dog and mouse, a consensual caspase motif is present (DXXD). In ape and human the site appears to be duplicated (DXXDDXXD).

We found that anti-MET antibodies directed against the C-terminal tail of the human receptor were not able to recognize truncated MET from the aspartic acid D1376 of the C-terminal caspase site (Supplementary data, Figure S3 A). Using these antibodies, we checked whether human p40 MET is cleaved in C-terminal. We transiently transfected MCF-7/caspase-3 cells with full length human MET WT, kinase dead or mutated in the juxtamembrane caspase site. Using an anti-MET antibody recognizing the kinase domain, the WT and kinase dead MET receptors and the corresponding p40 MET fragments were detected. As expected, the fragment was not generated from the mutant in the juxtamembrane caspase site (Figure 5B, left panel). In contrast, using the anti-human MET antibody recognizing the C-terminal extremity of the receptor, the full length MET were detected, whereas p40 MET fragments were not (Figure 5B, right panel). These results show that, similarly to mouse MET, p40 MET generated from human MET is cleaved in its C-terminal extremity.

In order to follow C-terminal and juxtamembrane endogenous cleavages of human MET during the apoptotic process, Hela cells were treated with anisomycin and lysed every hours. Western blot using anti-MET kinase revealed both full length MET, which detection

decreases only slightly along apoptosis, and p40 MET, generated from one hour after treatment (Figure 5C, left panel). In contrast, reprobe with anti-MET C-terminal antibody showed strong decrease of full length MET detection along apoptosis and absence p40 MET detection. Inversion of the order of probing between the antibodies gave similar results, demonstrating that decrease of detection observed with anti-MET C-terminal is not a consequence of filter stripping (supplementary data, S3 B). Similar results were obtained using staurosporine as another apoptotic inducer (data not shown). These results confirm the C-terminal cleavage of human p40 MET and further demonstrate the existence of a membrane anchored MET receptor C-terminally truncated. This shortened form of MET becomes even the major form of the receptor along apoptosis.

C-terminal cleavage of p40 MET enhances its pro-apoptotic activity

The consequence of this double and sequential caspase cleavage of MET is that mouse p40 MET generated during apoptosis is devoid of the 5 last amino acids. In order to evaluate the biological relevance of the C-terminal truncation of p40 MET, we engineered a p40 MET long (from the juxtamembrane cleavage site to the C-terminal end) and p40 MET small (from the juxtamembrane to the C-terminal cleavage site). Immunofluorescence analysis revealed expression of p40 MET constructs both in cytoplasm and nucleus of transiently transfected NIH3T3 fibroblasts. p40 MET small and p40 MET long-expressing cells were rounded and Hoechst staining showed characteristic signs of apoptosis, with either strong decrease of DNA contents or condensed DNA (Figure 6A, top panels). Similar results were obtained by counting the apoptotic nuclei in Hoechst staining. Interestingly, about 17% of p40 MET small-transfected cells were positive for active caspase-3 staining, while 12% of active caspase-3 positive cells were observed in p40 MET long-expressing cells, indicating that the C-terminal cleavage enhances the pro-apoptotic activity of the fragment (Figure 6A, lower panels). As a control, p40 MET small kinase dead-expressing cells displayed normal morphology, with percentage of active-caspase-3 positive cells corresponding to basal apoptosis in transfected cells (Figure 6). In addition, cells expressing TPR-MET ,the oncogenic form of MET with constitutive kinase activity, displayed normal morphology with similar percentage of active-caspase-3 positive cells and apoptotic nuclei than p40 MET kinase dead (Figure 6B), indicating that ectopic expression of constitutive active MET kinase does not lead to apoptosis.

To assess these results, p40 MET constructs were transfected in HEK 293 cells and cells were selected with G418, since the p40 MET expression vector contains this antibiotic

resistance gene. After ten days of selection, non transfected and p40 MET transfected cells died, whereas **more than 60 % of cells transfected with p40 MET kinase-dead survived, using empty vector as a reference (Figure 6C)**. In addition, we found that p40 MET small was more potent than p40 MET long to induce cell death **(Figure 6C)**. **This effect was even stronger with p40 MET D1371N mutated at the C-terminal caspase site, suggesting that cell death induced by p40 MET long is in part the consequence of further C-terminal cleavage**. Two days following transfection and before G418 selection, p40 MET expression was checked **(Figure 6D)**. At this stage, all the p40 MET were expressed and in contrast to p40 MET kinase-dead which was detected as a non-phosphorylated single band the p40 MET long and small were detected as a smear, corresponding to their phosphorylated and non-phosphorylated forms **(Figure 6D)**. Overall, these results demonstrate that the C-terminal cleavage of p40 MET fragment enhances its pro-apoptotic activity.

Mutation of C-terminal caspase site prevents cell death induced by mild stress

Generation of p40 MET can be prevented by two mutations in the juxtamembrane region (D1000N) and C-terminal tail (D1374N). However, TRK-MET D1000N cells display constitutive scattered phenotype **(Supplementary data, Figure S2)** and were resistant to apoptosis (Figure 2B). These observations are consistent with previous studies showing that mutation of the aspartic acid 1000 abrogates CBL association, which impairs normal down regulation of MET signaling (27). **In contrast, cells expressing TRK-MET WT and TRK-MET D1374N displayed normal islet organization and scattered similarly in response to NGF and HGF/SF, which activate transfected TRK-MET and endogenous MET receptors, respectively (Figure 7A)**. **In addition, in response to NGF, TRK-MET WT and D1374N were similarly able to recruit the signaling protein GRB2 and activate the MAPK ERK (Figure 7B)**. These results indicate that D1374N mutation does not modify basal and ligand-induced activity of TRK-MET chimera. We therefore used the TRK-MET D1374N cells to evaluate the involvement of p40 MET generation in apoptosis.

As shown above (Figure 2), treatment with anisomycin induced of caspase-3 at similar level in both TRK-MET WT and TRK-MET D1374N cells, suggesting that p40 MET generation does not influence this process. However, the concentration of anisomycin (50 μ M) was high and caused a strong and rapid cell death within few hours, which could hide involvement of p40 MET as a possible intrinsic amplifier. In order to evaluate the consequence of p40 MET generation during the apoptotic response, we treated TRK-MET

WT or TRK-MET D1374N cells with a low dose of anisomycin (0.3 μ M). In this mild stress condition, TRK-MET WT cells began to detach by day 3 and all cells died by day 7 (Figure 7D). This cell death correlated with generation of p40 MET detected by day 3 with progressive increase of expression until day 7 (Figure 7C). At day 7, caspase-3 activation was detected as well. In contrast, in TRK-MET D1374N cells, anisomycin treatment did not induce cell detachment, and caspase-3 or p40 MET were not detected even after 7 days. Therefore, the prevention of C-terminal cleavage of MET and subsequent decreased of p40 MET generation allowed resistance to cell death.

DISCUSSION

In this report, we show that the MET tyrosine kinase receptor is cleaved during apoptosis in a caspase-dependent manner in both its juxtamembrane and C-terminal regions. Mutation analysis in mouse MET demonstrates that these cleavages occur at aspartic acid 1000 and 1374. The C-terminal cleavage generates an undetectable fragment constituted by the last 5 amino acids of mouse MET. Nonetheless, this cryptic cleavage was evidenced using a C-terminal tagged version of the TRK-MET receptor, in which the loss of the C-terminal V5 epitope enlightens the cleavage.

The C-terminal tail of MET contains a multi-substrate docking site, constituted of two phosphorylated tyrosine residues (Y1347 and Y1354) able to interact with several cytoplasmic signal transducers, which mediate MET signaling (5). Downstream of this functional site, the amino acid sequence of the C-terminal extremity is poorly conserved along evolution (Figure 5A). However, we demonstrated that mouse and human MET receptors are cleaved by caspases in this extreme C-terminal sequence, within a functional caspase site. Sequences analysis suggests a strengthening of the C-terminal caspase site according to animal species. Indeed, no consensual caspase site is present in the C-terminal tail of fishes and xenopus MET, this site (DXXD) is present in chicken, dog and mouse and is duplicated in ape and human (DXXDDXXD). Thus, although the extreme C-terminal tail of MET is poorly conserved, we identified a functional caspase site which allows cleavage of MET during apoptosis.

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

The identification of the C-terminal cleavage and its functional consequences on p40 MET suggests that the C-terminal extremity is a regulatory domain. For some tyrosine kinase receptors, C-terminal tails were evidenced as negative regulatory domains. For instance, deletion of the C-terminal sequences of Tie2 or PDGF β -R potentiates their tyrosine kinase activity (29, 30). For MET an inhibitory role of the C-terminal tail has been proposed, based

on the fact that a peptide centered on the C-terminal multi-substrate binding site inhibited the MET kinase activity (31). Since the kinase activity of p40 MET is required for its apoptotic function, it is attractive to propose that the C-terminal cleavage relieve an inhibitory conformation, leading to an increase of its kinase activity and induction of an apoptotic response. However, the described peptide does not overlap the C-terminal extremity. In addition, we have shown that phosphorylation of p40 MET truncated or not are identical, suggesting that C-terminal cleavage does not regulate tyrosine kinase activity of MET.

Our demonstration that p40 MET is apoptotic raise the question whether it contributes to amplification of cells death following its generation through MET cleavages. The TRK-MET D1000N cells were useless for this purpose. Indeed, the aspartic acid D1000 belongs to the CBL binding motif (DYR) with the phosphorylated tyrosine residue Y1001 being the CBL binding site. CBL is an E3 ubiquitin ligase contributing to MET ubiquitination and down-regulation in response to HGF/SF (27). Similarly to the mutation of tyrosine 1001, the mutation of aspartic acid 1000 decreases CBL binding, which decreases MET down-regulation and leads to constitutive scattering of MDCK cells (25). In agreement with the survival property of the HGF/SF-activated MET receptor, we showed that cell expressing MET mutant at aspartic acid 1000 were more resistant to apoptosis. This mutant was then useless to investigate the consequence of the defect of p40 MET generation during apoptosis. However, in this present study, by identifying an additional caspase cleavage site, we generated a second mutant in which p40 MET generation is prevented. In contrast to D1000N mutation, D1374N mutation did not modify MET properties, **including its ability to mediate RAS-ERK signaling activation and cell scattering**. Under mild stress conditions, TRK-MET D1374N cells, which did not generate p40 MET, displayed prolonged cell survival compared to TRK-MET WT cells, indicating that p40 MET generation amplifies cell death. This amplification of apoptosis was not observed in MDCK expressing TRK-MET WT and D1374N, when high dose of anisomycin, which induced massive cell death within hours, was used. These results indicate that p40 MET generation is dispensable for induction of apoptosis induced by strong stress stimuli, while it is able to switch the cells to apoptosis in mild stress conditions. **In this line, it is worth noticing that p40 MET is not a strong inducer of apoptosis, with level of apoptosis in p40 MET transfected cells not exceeding twenty percent of transfected population. We therefore conclude that p40 MET can act as an amplifier rather than as an inducer of apoptosis.**

Although many caspases substrates are cleaved at several sites (32), the possible hierarchical organization of these cleavages are poorly defined. The RasGAP protein is

cleaved at several sites by caspase-3, with the first cleavage occurring soon during apoptosis and favoring the second one (33, 34). The first cleavage allows generation of an anti-apoptotic fragment, whereas the second cleavage converts it in smaller pro-apoptotic fragments. In this instance, sequential cleavage supports a model in which RasGAP functions as a sensor of caspase activity to determine whether or not a cell will survive. When caspases are mildly activated, the partial cleavage of RasGAP protects cells from apoptosis. When caspase activity reaches levels that allow full cleavage of RasGAP, the resulting fragments turn into potent proapoptotic molecules (35). In the case of MET, its sequential cleavages lead to the generation of a shortened MET, cleaved only in its C-terminal region. Although, following this first cleavage, the juxtamembrane cleavage allows generation of p40 MET, the shortened MET becomes along apoptotic process the major form of membrane MET receptors. This novel form of MET potentially inducible by HGF/SF could acquire specific functions, which could be involved as well in the regulation of the balance survival/apoptosis mediated by the tyrosine kinase receptor MET.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

MATERIALS AND METHODS

Cytokines, drugs and cell cultures

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

Plasmid constructions

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

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

The N-terminal Flag p40 MET long was constructed as follows. The mouse MET from the juxtamembrane caspase site to the C-terminal end was amplified by PCR using TRK-MET WT as template and the following primers: 5' CAAATGAGTCTGGATCCTACAGAGCTAC 3' containing the BamHI restriction site and the primer 5' CCTCGAACTCGAGACCTCAAGTGTTCCC 3' containing the XhoI restriction site. The N-terminal Flag p40 MET small and p40 MET small kinase dead version (p40 MET Small K1108A) were constructed as follows. The mouse MET from the juxtamembrane caspase site to the C-terminal caspase site was amplified by PCR using TRK-MET WT and TRK-MET K1108A as templates and the following primers: 5' CAAATGAGTCTGGATCCTACAGAGCTAC 3' containing the BamHI restriction site and the primer 5' TCTCGAGTTCCCCTCTCAATCAATGTTGTC 3' containing the XhoI restriction site. The sequences obtained were cloned using BamHI/XhoI in frame with Flag sequence in pcDNA3 vector.

The oncogene TPR-MET was constructed as follows. TPR-MET sequence was amplified by PCR using pXM139 SMS TPR-MET as template (generously gift by Morag Park, McGill University, Montreal, Quebec, Canada) and the primers 5' GCGCCGGCCTCGAGTCATGGCGGCGGTG 3' containing the XhoI restriction site and 5' TCAGTCTAGATCTGATGCTCTGTCTCAG 3' containing the XbaI restriction site. The TPR-MET sequence was cloned in pcDNA3 vector using the XhoI/XbaI sites. The TPR-MET kinase dead (TPR-MET KD) in which lysine 1110 was replaced by arginine was created using the QuickChange site-directed mutagenesis system from Stratagene using pcDNA3 TPR-MET as template and the following primers : 5' CACTGTGCTGTGGCATCCTTGAACAGAATC 3' and 5' GATTCTGTTCAAGGATGCCACAGCACAGTG 3'. TPR-MET truncated from aspartic acid 1376 (TPR-MET δ Ct) was created using the QuickChange site-directed mutagenesis system using pcDNA3 TPR-MET as template and the following primers : 5'

GATAACGCTGATTAGTGCTAGTACTATGTC 3' and 5'
GACATAGTACTAGCACTAATCAGCGTTATC 3'.

Antibodies

Mouse monoclonal antibody directed against mouse MET (B-2) and rabbit polyclonal antibodies against C-terminal region of human MET (C-28 and C-12), against mouse MET (SP-260) and against Erk2 (C-14) were purchased from Santa-Cruz Biotechnology. Mouse monoclonal antibodies directed against the kinase domain of MET (25H2) and directed against phosphorylated ERK and rabbit polyclonal antibody against cleaved caspase-3 were purchased from Cell Signaling Technology. Rabbit polyclonal antibody against phosphorylated tyrosines 1234 and 1235 of MET kinase domain was purchased from Upstate Biotechnology. Rabbit polyclonal antibody against caspase-3 was purchased from Stressgen Biotechnologies. Mouse monoclonal antibody directed against V5 tag was purchased from Invitrogen. Mouse monoclonal antibody against GRB2 was purchased from Transduction Laboratories. Peroxydase, fluorescein and rhodamine conjugated antibodies directed against rabbit and mouse IgG were purchased from Jackson Immunoresearch Labs.

Western blotting

MDCK and MCF-7 cells ($3 \cdot 10^5$ cells / 35 mm-dish) transfected or not were cultured one day in DMEM-10% FCS and RPMI-10% FCS, respectively, and treated or not with anisomycin, TNF α /cycloheximide or staurosporine in serum free medium. Adherent cells and cells in suspension, collected after centrifugation of the medium, were lysed and protein concentration determined by Bio-Rad protein assay. Western blotting was performed as described previously (36). Results are representative of at least two experiments.

Trypan Blue staining

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

Caspase cleavage reaction

Caspase cleavages using cell extract were performed as follows. MDCK cells stably transfected with the TRK-MET chimeras (3×10^5 cells / 35 mm-dish) were cultured one day in DMEM-10% FCS and then lysed in 100 μ l of caspase buffer (20 mM PIPES pH 7.2; 100mM NaCl; 1% Chaps; 10% sucrose; 5mM DTT; 0.05 mM EDTA). Cell extracts were incubated 4 h at 37°C with 1 μ l of purified caspase. Proteins were then resolved on SDS-PAGE and submitted to Western blotting (36). Purified active caspases were generously provided by Dr. G.S. Salvesen (The Burnham Institute, La Jolla, USA). **Their activity has been checked twice on the synthetic substrate Ac-LEHD-AFC for the caspase-9 and on Ac-DEVD-AFC substrate for the other caspases.**

Transfections

Transient and stable transfections of MDCK cells were performed as described previously using the lipofection method (26). For transient transfection of NIH3T3 fibroblasts, 8×10^4 cells were cultured in 12-well plates and were incubated with a mixture of DNA (1 μ g/ml) and Lipofectamine (Invitrogen; 20 μ g/ml). MCF7 cells (3×10^5) were cultured in 6-well plates and were incubated with a mixture of DNA (1.25 μ g/ml) and PEI/ExGen 500 (Euromedex).

Immunofluorescence

NIH3T3 cells (80×10^3 cells / 24 mm-dish) were cultured for one day in DMEM-10% CS on glass cover slips and transiently transfected as described above. 48h after transfection, cells were washed, fixed with 4% paraformaldehyde (PFA), permeabilized with 0.1% triton X-100, and blocked with 0.2% casein for 30 min. Cells were incubated 60 min with a combination of mouse anti-Met antibody (1:200) and rabbit anti-active caspase-3 antibody (1:200). Cells were then washed and incubated with a combination of fluorescein-conjugated anti-mouse IgG (7 μ g/ml) and rhodamine-conjugated anti-rabbit IgG (7 μ g/ml). Cell nuclei were counterstained using Hoechst 33258. Cover slips were mounted with Glycergel mounting medium (Dako) and fluorescence examined using a Zeiss Axioplan2. Results presented are representative of three experiments.

Colony formation assay

For the colony formation assay, 6×10^5 HEK293 cells/well were plated in 6-well plates, and the next day transient transfections were performed using the polyethyleneimine Exgen 500 procedure (Euromedex) using 1 μ g of DNA/well. Two days after transfection, cells were split

into three 100-mm dishes containing DMEM-10% FCS, and the next day the medium was supplemented with 1.1 mg/ml G418 (Gibco). After two weeks, cells were counted.

Supplementary information is available at Cell Death and Differentiation's website.

REFERENCES

1. Nakamura T, Nawa K and Ichihara A. (1984) Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 122(3): 1450-9.
2. Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino GK, Bardelli A, Ponzetto C, Narsimhan RP, Hartmann G, Zarnegar R, Michalopoulos G, Birchmeier W and Comoglio PM. (1991) Scatter factor and hepatocyte growth factor are undistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J.* 10: 2867-2878.
3. Stoker M and Perryman M. (1985) An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J Cell Sci.* 77: 209-23.
4. Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L and Comoglio PM. (1994) Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene.* 9(1): 49-57.
5. Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, Graaziani A, Panayotou G and Comoglio PM. (1994) A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell.* 77: 261-271.
6. Weidner KM, Dicesare S, Sachs M, Brinkmann V, Behrens J and Birchmeier W. (1996) Interaction between *gab1* and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature.* 384(6605): 173-176.
7. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E and Vande Woude GF. (2003) Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(12): 915-25.
8. Crepaldi T, Prat M, Giordano S, Medico E and Comoglio PM. (1994) Generation of a truncated hepatocyte growth factor receptor in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 269(3): 1750-5.
9. Gandino L, Longati P, Medico E, Prat M and Comoglio PM. (1994) Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *J Biol Chem.* 269(3): 1815-20.
10. Peschard P, Fournier TM, Lamorte L, Naujokas MA, Band H, Langdon WY and Park M. (2001) Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell.* 8(5): 995-1004.
11. Villa-Moruzzi E, Puntoni F, Bardelli A, Vigna E, De Rosa S and Comoglio PM. (1998) Protein tyrosine phosphatase PTP-S binds to the juxtamembrane region of the hepatocyte growth factor receptor Met. *Biochem J.* 336(Pt 1): 235-9.
12. Vigna E, Gramaglia D, Longati P, Bardelli A and Comoglio PM. (1999) Loss of the exon encoding the juxtamembrane domain is essential for the oncogenic activation of TPR-MET. *Oncogene.* 18(29): 4275-81.
13. Kosai K, Matsumoto K, Nagata S, Tsujimoto Y and Nakamura T. (1998) Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 244(3): 683-90.
14. Bowers DC, Fan S, Walter KA, Abounader R, Williams JA, Rosen EM and Laterra J. (2000) Scatter factor/hepatocyte growth factor protects against cytotoxic death in human glioblastoma via phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT- dependent pathways. *Cancer Res.* 60(15): 4277-83.
15. Xiao GH, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsuuchi Y, Vande Woude GF and Testa JR. (2001) Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(1): 247-52.

16. Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A and Birchmeier C. (1995) Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*. 376(6543): 768-71.
17. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E and Birchmeier C. (1995) Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*. 373: 699-702.
18. Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shlota K, Kuno J, Noda T and Kitamura N. (1995) Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature*. 373: 702-705.
19. Tulasne D, Deheuninck J, Lourenco FC, Lamballe F, Ji Z, Leroy C, Puchois E, Moumen A, Maina F, Mehlen P and Fafeur V. (2004) Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. *Molecular and cellular biology*. 24(23): 10328-39.
20. Degtrev A, Boyce M and Yuan J. (2003) A decade of caspases. *Oncogene*. 22(53): 8543-67.
21. Sakahira H, Enari M and Nagata S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 391(6662): 96-9.
22. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A and Nagata S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 391(6662): 43-50.
23. Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J and Breard J. (2001) Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature cell biology*. 3(4): 346-52.
24. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A and Olson MF. (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature cell biology*. 3(4): 339-45.
25. Weidner KM, Sachs M and Birchmeier W. (1995) Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 2597-2601.
26. Tulasne D, Paumelle R, Weidner KM, Vandebunder B and Fafeur V. (1999) The multisubstrate docking site of the MET receptor is dispensable for MET-mediated RAS signaling and cell scattering. *Mol Biol Cell*. 10(3): 551-65.
27. Peschard P, Ishiyama N, Lin T, Lipkowitz S and Park M. (2004) A conserved DpYR motif in the juxtamembrane domain of the Met receptor family forms an atypical c-Cbl/Cbl-b tyrosine kinase binding domain binding site required for suppression of oncogenic activation. *Journal of biological chemistry*, The. 279(28): 29565-71.
28. Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR and Porter AG. (1998) Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*. 273(16): 9357-60.
29. Chiara F, Bishayee S, Heldin CH and Demoulin JB. (2004) Autoinhibition of the platelet-derived growth factor beta-receptor tyrosine kinase by its C-terminal tail. *J Biol Chem*. 279(19): 19732-8.
30. Niu XL, Peters KG and Kontos CD. (2002) Deletion of the carboxyl terminus of Tie2 enhances kinase activity, signaling, and function. Evidence for an autoinhibitory mechanism. *J Biol Chem*. 277(35): 31768-73.
31. Bardelli A, Longati P, Williams TA, Benvenuti S and Comoglio PM. (1999) A peptide representing the carboxyl-terminal tail of the met receptor inhibits kinase activity and invasive growth. *J Biol Chem*. 274(41): 29274-81.
32. Fischer U, Janicke RU and Schulze-Osthoff K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell death and differentiation*. 10(1): 76-100.

33. Yang JY and Widmann C. (2001) Antiapoptotic signaling generated by caspase-induced cleavage of RasGAP. *Mol Cell Biol.* 21(16): 5346-58.
34. Yang JY, Michod D, Walicki J, Murphy BM, Kasibhatla S, Martin SJ and Widmann C. (2004) Partial cleavage of RasGAP by caspases is required for cell survival in mild stress conditions. *Molecular and cellular biology.* 24(23): 10425-36.
35. Yang JY, Michod D, Walicki J and Widmann C. (2004) Surviving the kiss of death. *Biochem Pharmacol.* 68(6): 1027-31.
36. Paumelle R, Tulasne D, Kherrouche Z, Plaza S, Leroy C, Reveneau S, Vandebunder B, Fafeur V and Tulashe D. (2002) Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene.* 21(15): 2309-19.

LEGENDS

Figure 1: Tagged version of TRK-MET reveals C-terminal caspase cleavage

(A) MDCK epithelial cells, stably transfected with the TRK-MET V5 WT chimera, were pretreated or not for 1 h with HGF/SF (10 ng/ml) or NGF (100 ng/ml) and then treated or not for 12 h with anisomycin (Ani., 50 μ M).

(B) MDCK epithelial cells, stably transfected with the TRK-MET V5 WT chimera, were treated for 8 h with anisomycin (Ani., 50 μ M), in the presence or absence of zVAD-FMK (zVAD, 20 μ M). (A,B) For each condition, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western-blotting using an antibody directed against mouse MET (top panel). The membrane was stripped and reprobed sequentially using an anti-V5 antibody (right panel) and an anti-Erk2 antibody to assess comparable loading (lower panel). Lower part of the filter was analyzed by Western-blotting using an anti-active caspase-3 antibody (middle panel). Arrows indicate positions of the p150 TRK-MET (fully glycosylated), p125 TRK-MET (partially glycosylated) and p40 MET fragment.

(C) Schematic representation of the TRK-MET V5-His receptor with murine sequences of the juxtamembrane caspase site and putative C-terminal caspase site.

(D) Cell extracts of MDCK, stably transfected with the TRK-MET V5 WT, D1000N, D1374N, D1000/1374N, were incubated with purified caspase-3. Samples were then resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western-blotting using an anti-mouse MET antibody (left panel). The filter was stripped and reprobed using an anti-V5 antibody (right panel). Arrows indicate positions of the p150 TRK-MET, p125 TRK-MET, p40 MET fragment and p40 MET-V5 fragment.

Figure 2: Mutation of the C-terminal caspase site inhibits juxtamembrane cleavage

(A) MDCK cells were transiently transfected with vectors either empty or expressing TRK-MET V5 WT, D1000N, D1374N and D1000/1374N. The following day, cells were lysed. For each condition, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western-blotting using an antibody directed against mouse MET (left panel). The filter was stripped and reprobed using an anti-V5 antibody (right panel). Arrows indicate positions of TRK-MET V5 and lines indicate positions of p40 MET and p40 MET V5 fragments.

(B) MDCK epithelial cells, stably transfected with the TRK-MET V5 WT, D1000N, D1374N, D1000/1374N were treated for 8 h with anisomycin (Ani., 50 μ M). For each

condition, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western-blotting using an anti-mouse MET antibody (top panel). The filter was stripped and reprobed sequentially using an anti-V5 antibody (right panel) and an anti-Erk2 antibody to assess comparable loading (lower panel). Lower part of the filter was analyzed by Western-blotting using an anti-active caspase-3 antibody (middle panel). Arrows indicate positions of TRK-MET V5, p40 MET and p40 MET-V5 fragments.

(C) Stable MDCK cells were treated for 8 h with either anisomycin (Ani., 50 μ M) or TNF α (30 ng/ml) / cycloheximide (CHX, 10 μ g/ml). Cells were then stained with Trypan Blue. Percentage of dead cells stained in blue were determined (n=3; +/- SD).

Figure 3: Generation of p40 MET induced during apoptotic process

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

Figure 4: Caspase-3 cleaves the MET receptor

(A) Cell extracts of MDCK, stably transfected with the TRK-MET V5 WT chimera, were incubated with purified caspase-3, -6, -7, -8 or -9. Samples were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western-blotting using an antibody directed against mouse MET (left panel). The filter was stripped and reprobed using an anti-V5 antibody (right panel). Arrows indicate positions of the p150 TRK-MET (fully glycosylated), p125 TRK-MET (partially glycosylated) and p40 MET fragment.

(B) MCF-7 and MCF-7/caspase-3 cells were transiently transfected with vectors either empty or expressing TRK-MET V5 WT. The following day, cells were lysed. For each condition, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western-blotting using an anti-mouse MET antibody (left panel). The filter was stripped and reprobed using an anti-V5 antibody (right panel). Western-blotting using an anti-caspase-3 antibody was performed to assess expression of caspase-3 in MCF-7 and MCF-7/caspase-3. Arrows indicate positions of the p150 TRK-MET (fully glycosylated), p125 TRK-MET (partially glycosylated) and p40 MET fragment.

Figure 5: Human MET is cleaved by caspases in its C-terminal extremity

(A) Alignment of the amino acid sequences of *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Canis familiaris*, *Pan troglodytes* and *Homo sapiens* MET tyrosine kinase receptor. The tyrosine residues of the C-terminal multi-substrate binding site are in bold and the putative caspase sites are in bold and underlined.

(B) Caspase-3 reconstituted MCF-7 cells were transiently transfected with 1 µg/ml of vector either empty or expressing human-MET WT, kinase dead (KD) or **uncleavable mutant (Juxta. Mutant)** in which the valine residue V1001 of the juxtamembrane cleavage site was replaced by alanine. (V1001 in the human sequence corresponds to V999 in the murine sequence). The following day, cells were lysed. For each condition, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western-blotting using an antibody directed against the kinase domain of MET (left panel). The filter was stripped and reprobed using an antibody recognizing the C-terminal extremity of human MET (C-28 antibody) (right panel). Arrows indicate positions of immature and mature MET and p40 MET fragment.

(C) HeLa cells were treated for the indicated times with anisomycin (Ani., 50 µM). For each condition, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western-blotting using an antibody directed against the kinase domain of MET (left panel). The filter was stripped and reprobed using an antibody recognizing the C-terminal extremity of human MET (C-12 antibody) (right panel). Lower part of the filter was analyzed by Western-blotting using an anti-active caspase-3 antibody (lower panel). Arrows indicate positions of immature and mature MET and p40 MET fragment.

Figure 6: C-terminal cleavage enhances cell death induced by p40 MET

(A and B) NIH3T3 cells were transiently transfected with vectors expressing either p40 MET small wild-type (p40 MET small), p40 MET small kinase dead (p40 MET KD), p40 MET long or **TPR-MET**. 48 hours after transfection, nuclei were detected using Hoechst staining (Hoechst, Blue staining) and immunofluorescence was performed using an anti-MET antibody (Anti-MET, green staining) and an anti-cleaved caspase-3 (Anti-cleaved Caspase-3, red staining). White arrows indicate representative cells expressing transfected p40 MET. Percentage of caspase-3 positive cells and **apoptotic nuclei (condensed DNA)** over MET transfected cells was determined. At least 200 cells were counted per well in three different wells (n=3; +/- SD).

(C) HEK293 cells, cultured in 6-well plates, were transfected or not with empty vector or vector expressing p40 MET small, p40 MET small KD, p40 MET long or p40 MET long D1371N. Two days later, cells were split into four 100-mm dishes and the remaining cells were lysed for Western blot analysis (D). Cells were then selected ten days with G418 and counted. Results are represented as percentage of surviving cells using empty vector transfection as reference (n=3; +/- SD). One dish from each condition was also stained and shown (lower panel).

(D) Cell extracts prepared the second day after transfection were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western-blotting using an anti-mouse MET antibody to assess expression from the transfected vector (top panel). The filter was stripped and reprobbed using an anti-phospho MET antibody (lower panel).

Figure 7: Influence of the C-terminal caspase site mutation in cell death induced by mild stress

(A) MDCK epithelial cells expressing TRK-MET V5 WT and D1374N were seeded at low density. Two days later, cells were cultured for 24 h in the absence (-) or presence of 10 ng/ml of HGF/SF or 100 ng/ml of NGF and photographs were taken (Magnification x 80).

(B) MDCK epithelial cells (1.10^6 cells / 100 mm-dish) expressing or not TRK-MET V5 WT and D1374N were cultured over-night in DMEM-0% FCS and stimulated or not 10 min with 200 ng/ml of NGF. For each condition, the same amount of whole cell lysat was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western-blotting using an anti-mouse MET antibody (first panel) or an anti-phosphorylated ERK1 and 2 (second panel) antibody. The filter was stripped and reprobbed using an anti-ERK2 antibody (third panel). From the same extracts, immuno-precipitation was performed using a polyclonal antibody against mouse MET and processed for Western-blotting using an anti-GRB2 antibody (last panel).

(C) MDCK epithelial cells (2.10^5 cells / 35 mm-dish), stably transfected with the TRK-MET V5 WT or D1374N were cultured one day in DMEM-10% FCS and treated with anisomycin (Ani., 0.3 μ M). Every day, cells were lysed and proteins were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western-blotting using an antibody directed against mouse MET (top panels). Similar extracts were resolved by a 12% SDS-PAGE and Western blotting was performed using an anti-active caspase-3 antibody (lower panel). Arrows indicate positions of TRK-MET V5 and p40 MET. (D) Photographs were taken on light microscopy before lysis (Magnification x 40).

Figure S1: Generation of p40 MET following transient transfection is abolished by caspase inhibitor

MDCK and MCF-7/caspase-3 cells were transiently transfected with vectors either empty or expressing TRK-MET V5 WT and then treated or not with zVAD-FMK (zVAD, 20 μ M). The following day, cells were lysed. For each condition, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western-blotting using an antibody directed against mouse MET. Arrows indicate positions of TRK-MET V5 and p40 MET fragment.

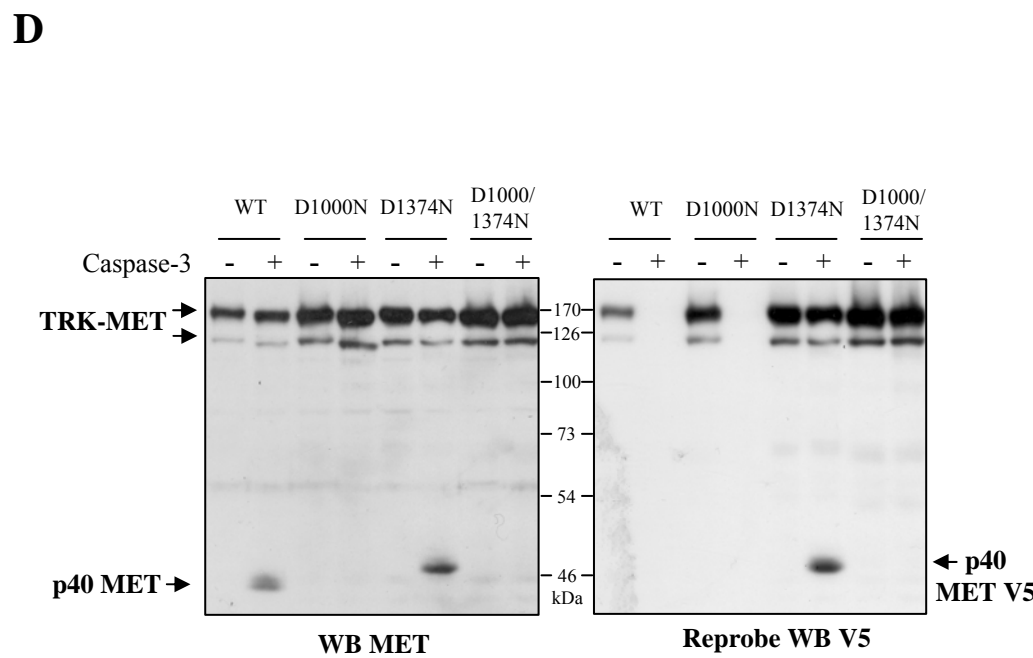
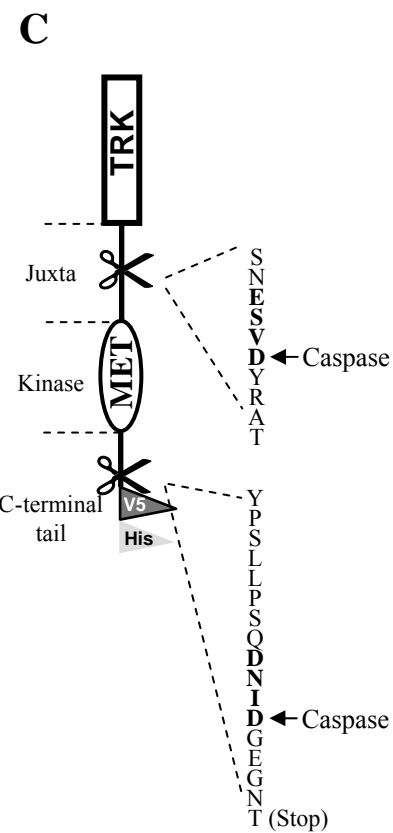
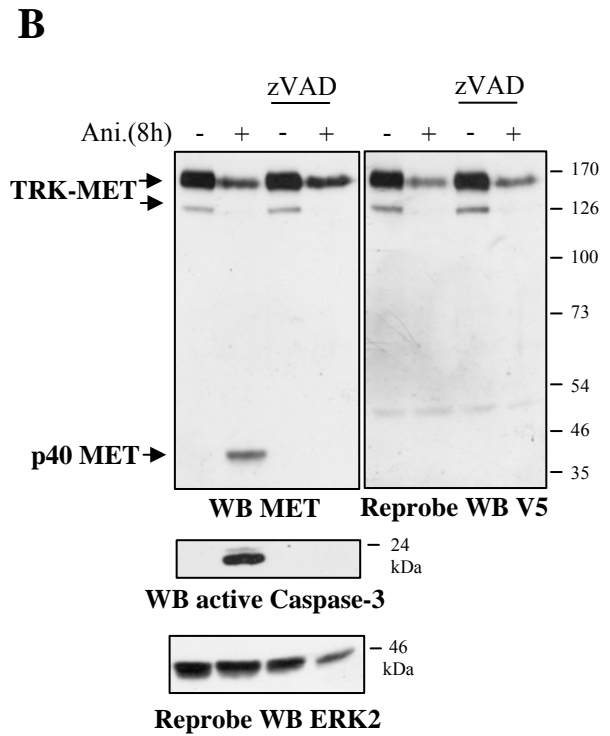
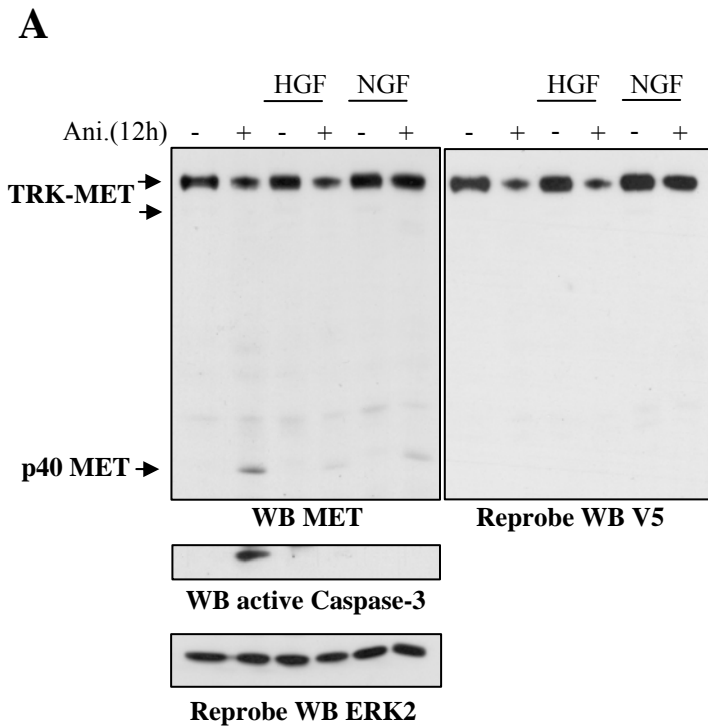
Figure S2: Basal scattering of MDCK cells expressing TRK-MET mutants

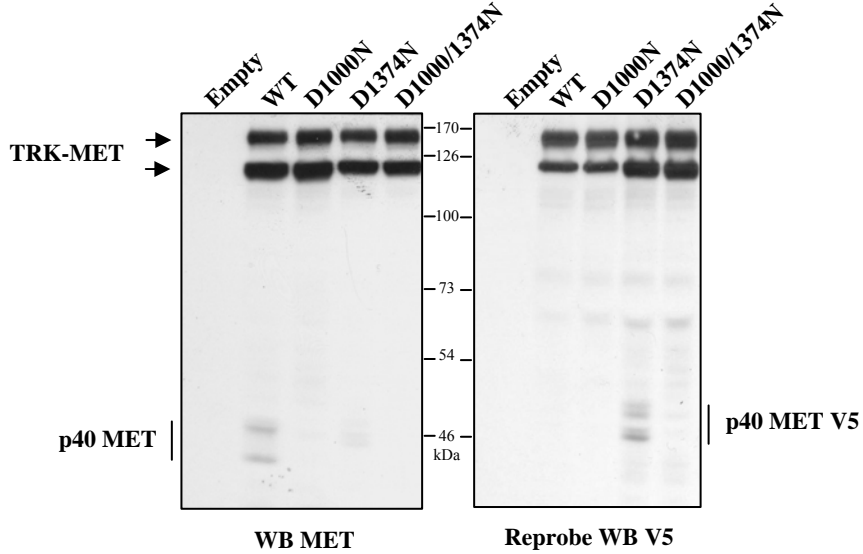
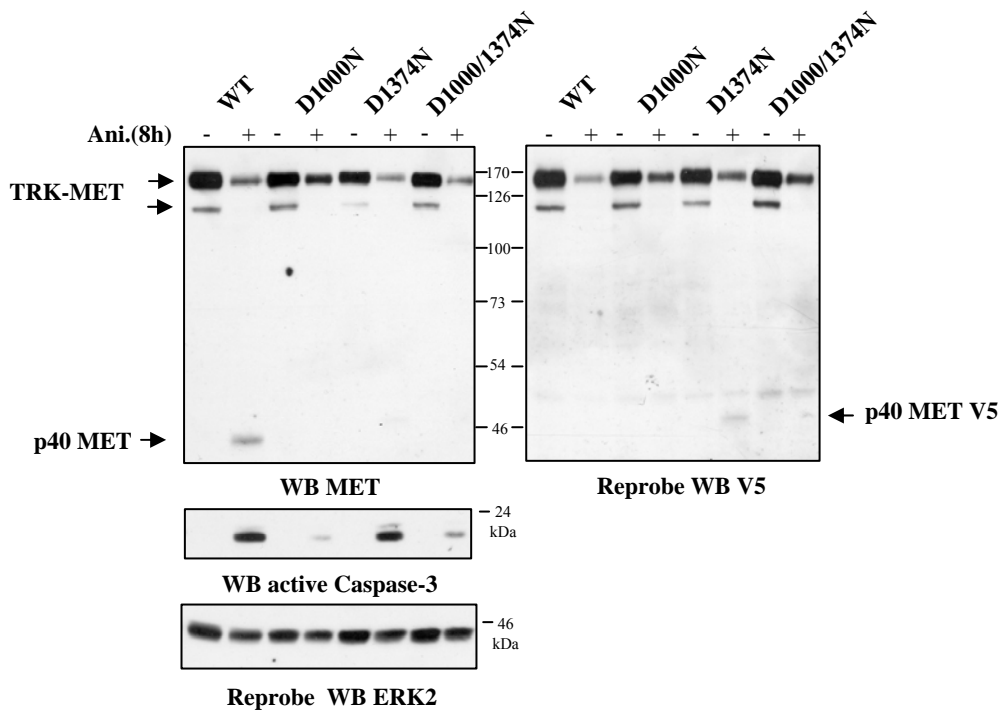
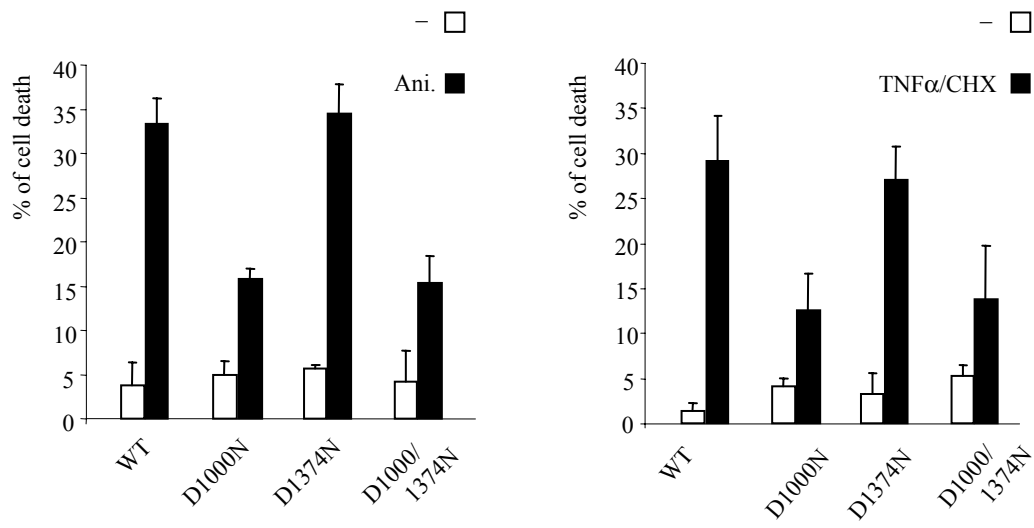
MDCK epithelial cells, expressing TRK-MET V5 WT, D1000N, D1374N and D1000/1374N ($2 \cdot 10^5$ cells / 35 mm-dish) were cultured in DMEM-10% FCS and photographs were taken.

Figure S3: Recognitions of C-terminal human MET by specific antibodies

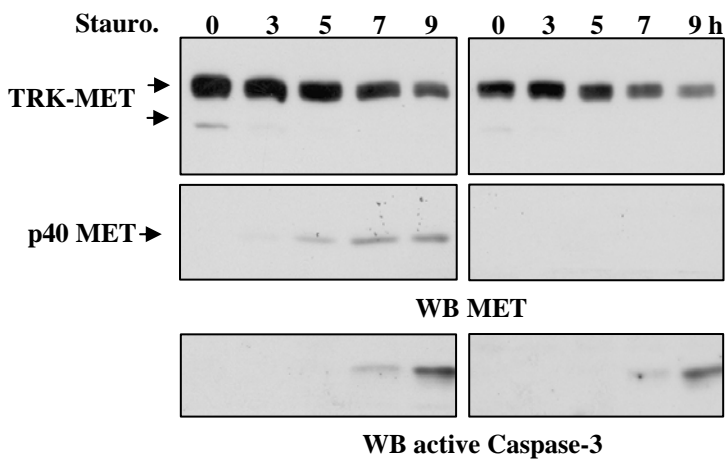
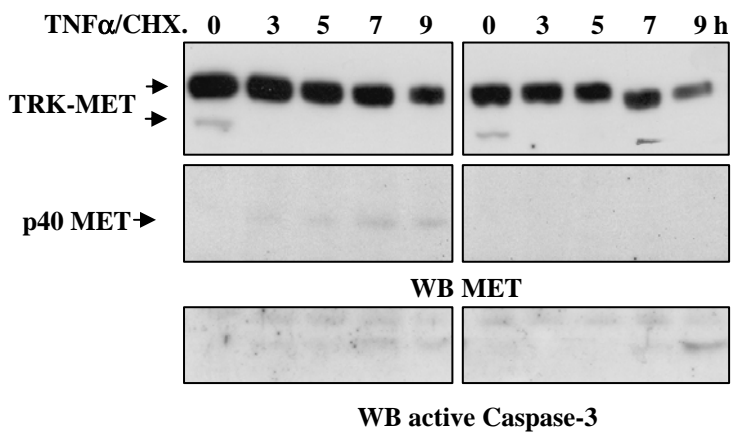
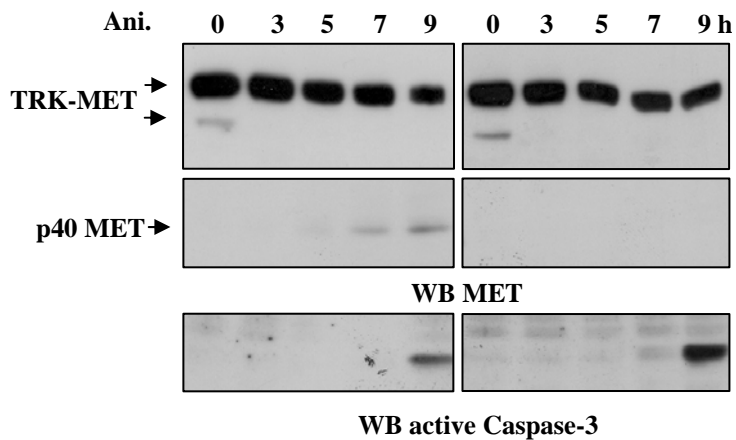
(A) HEK293 cells were transfected with vectors either empty or expressing TPR-MET, TPR-MET kinase dead (TPR-MET KD) or TPR-MET truncated in C-terminal from aspartic acid D1376 (TPR-MET δ Ct). The following day, cells were lysed and proteins were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western-blotting using an antibody directed against the kinase domain of MET (left panel). The membrane was stripped and reprobed sequentially using antibodies directed against C-terminal tail of human MET (middle panel: C-12 antibody and right panel: C-28 antibody)

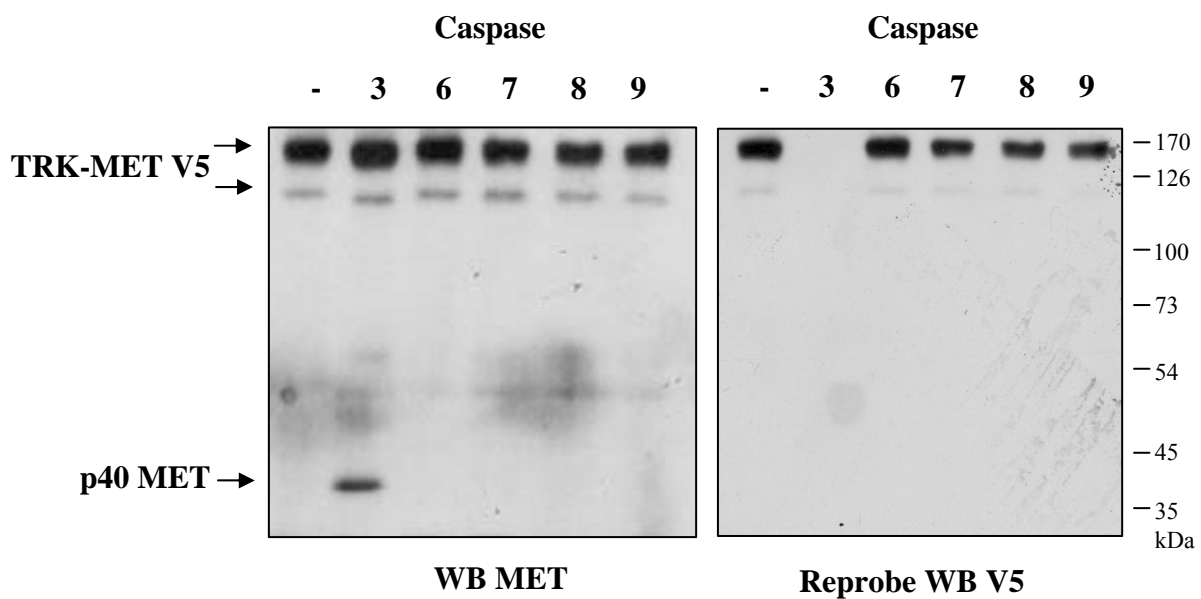
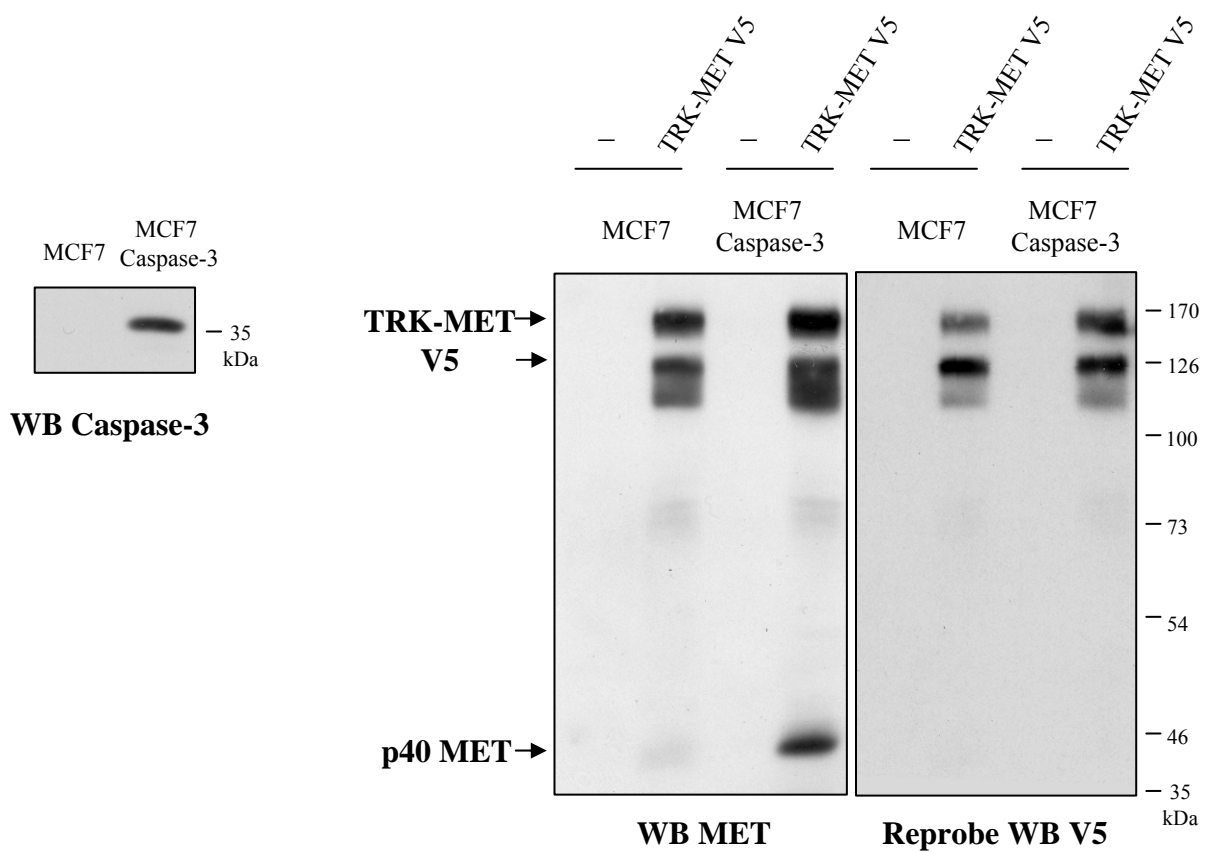
(B) Hela cells were treated for 3 h with anisomycin (Ani., 50 μ M). For each condition, the same amount of proteins was resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western-blotting using an antibody directed against the kinase domain of MET (Upper left panel, 1). The filter was stripped and reprobed using an antibody recognizing the C-terminal extremity of human MET (C-12 antibody) (lower right panel, 2). Cell extracts were also resolved in the same conditions and analyzed first using the anti-C-terminal human MET antibody (C-12) and reprobed using the anti- MET kinase antibody.



A**B****C**

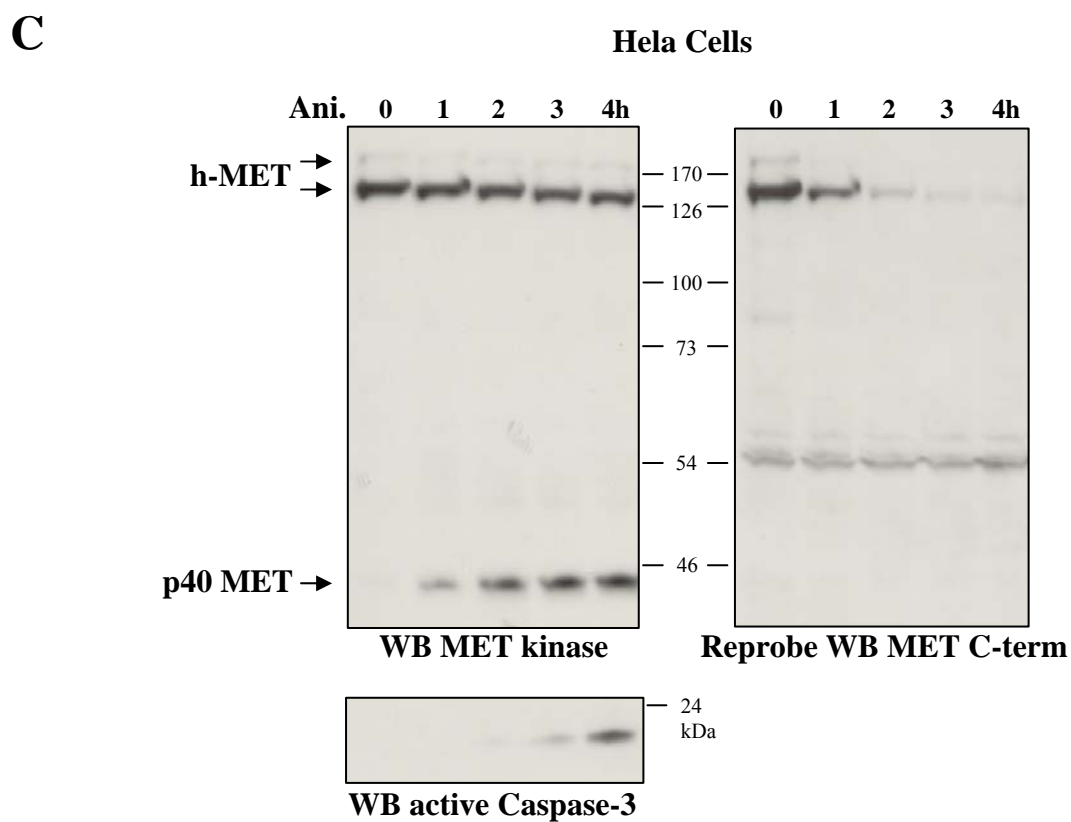
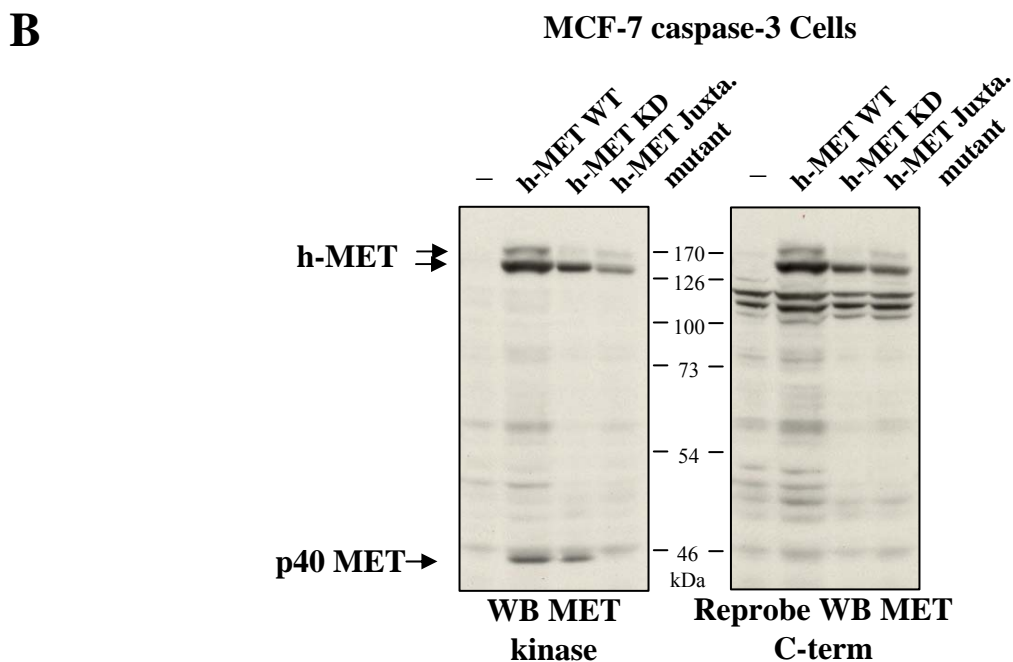
TRK-MET WT TRK-MET D1374N

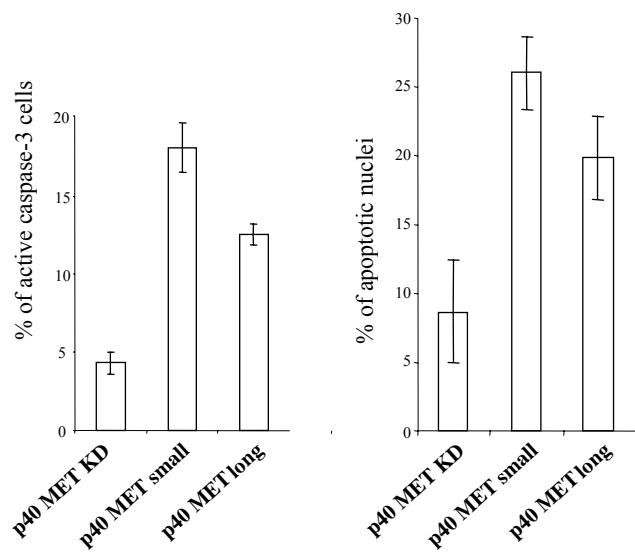
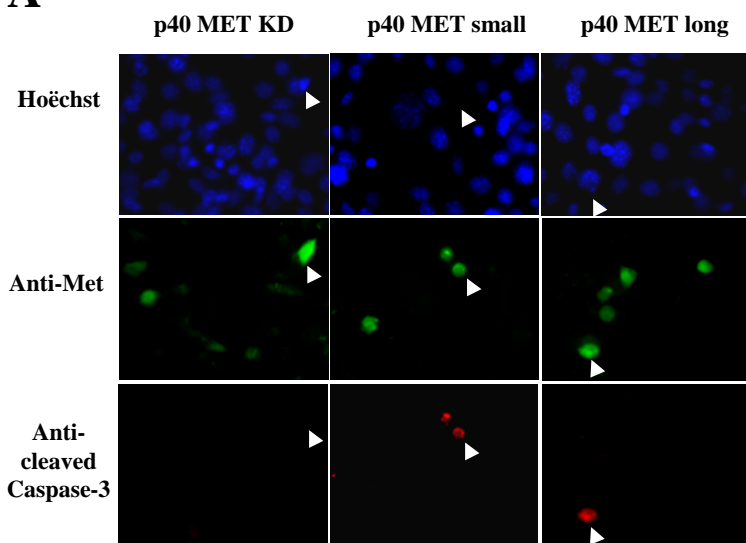
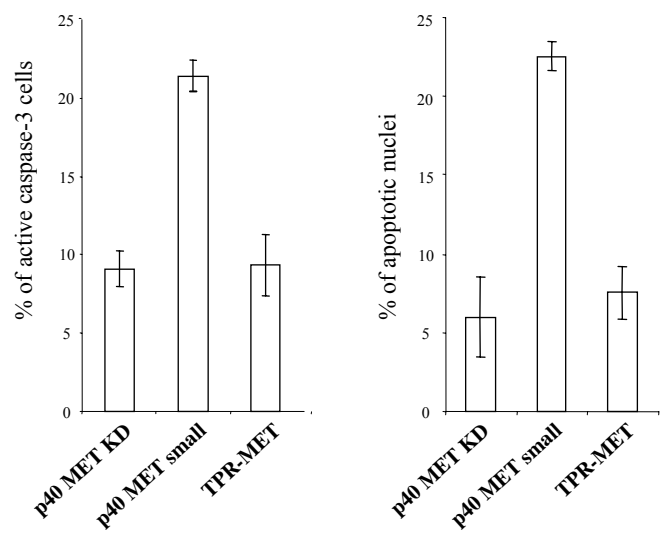
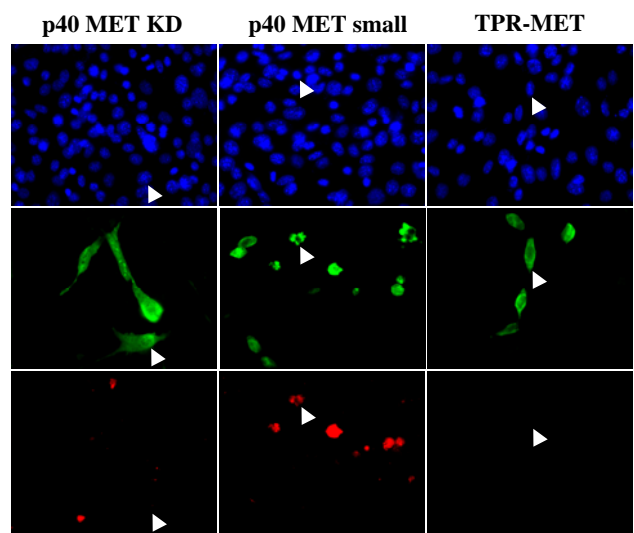
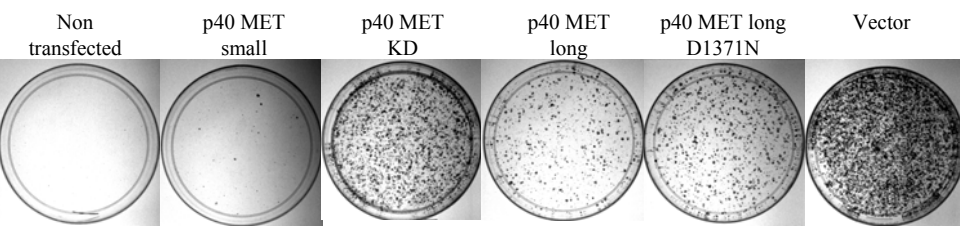
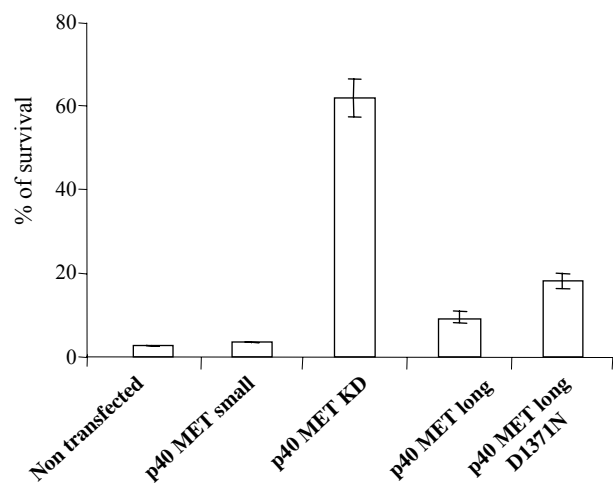
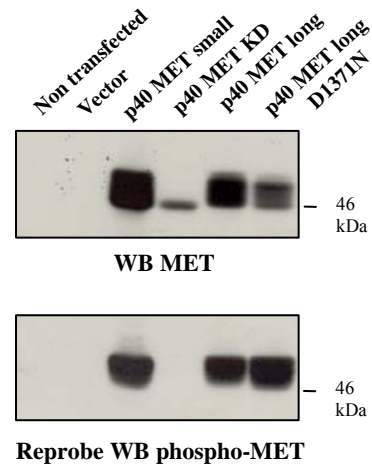


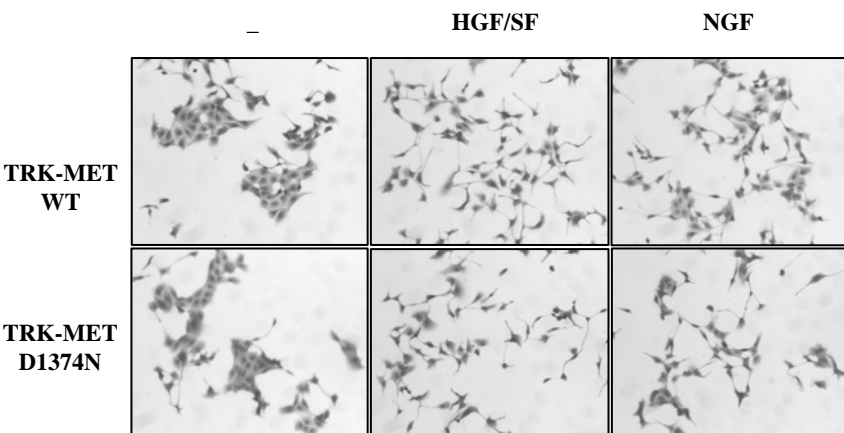
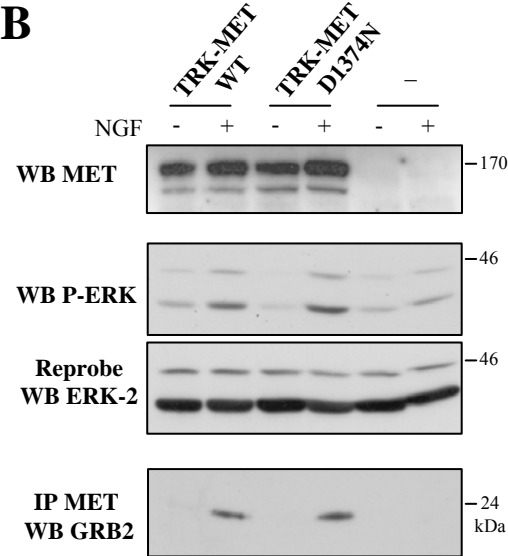
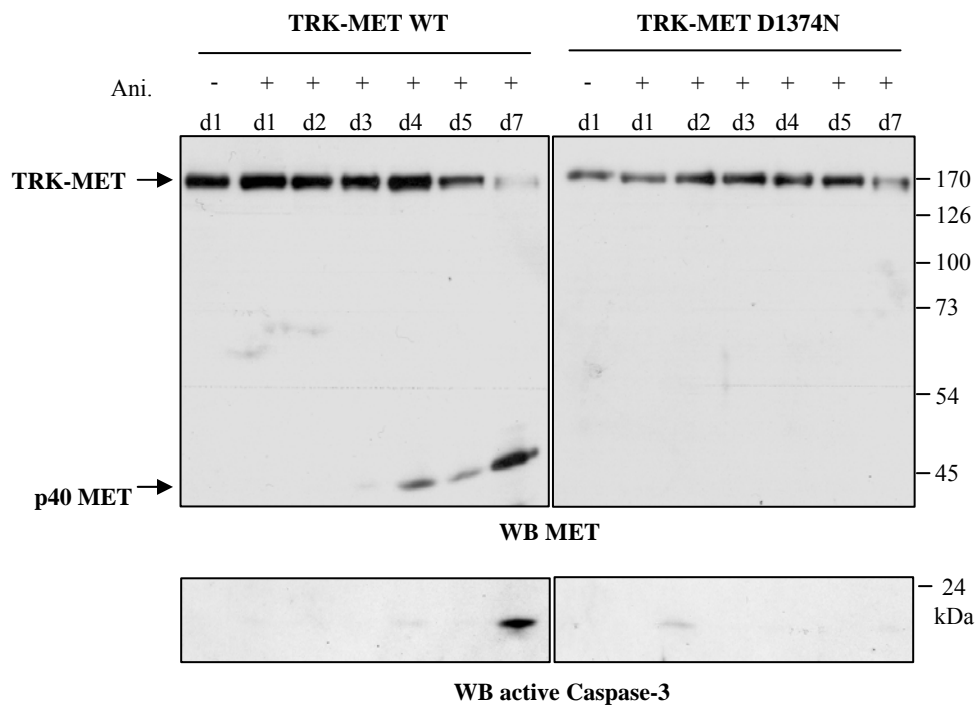
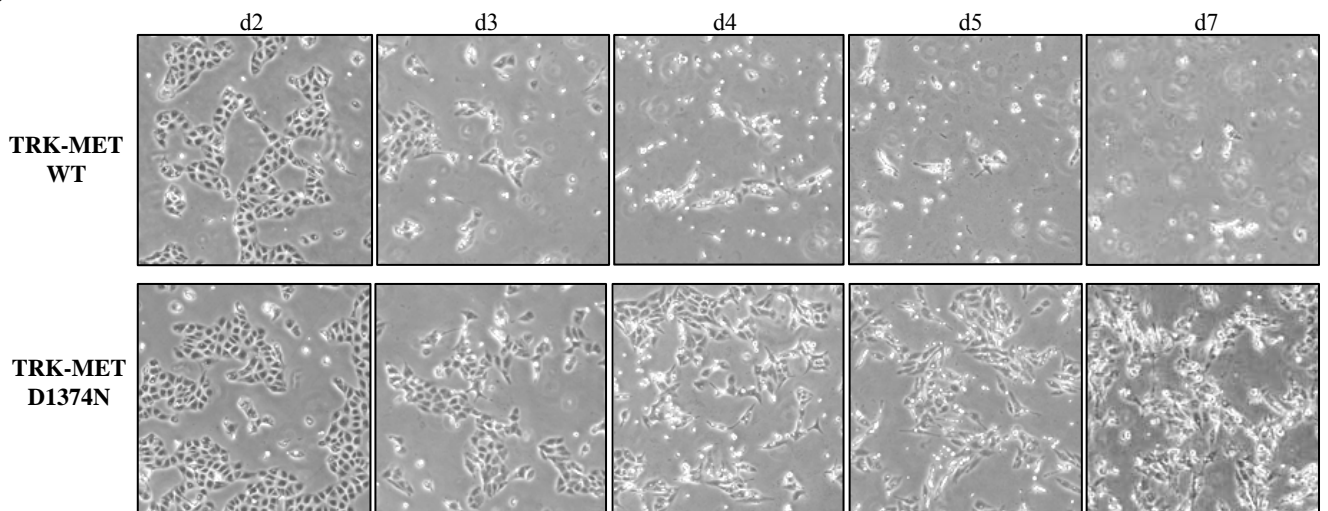
A**B**

A

Danio renio	GEHYILLNNTTYVNIIDKMTYPYPSLLI SSQSNLDRDCCT
Xenopus laevis	GEHYVLFNATYVNIKCAAPYPSLLS SPEGNIEFSIDT
Gallus gallus	GEHYVHVNATYVNVKCVAPYPSLLS SQDNTDMDVDT
Mus musculus	GEHYVHVNATYVNVKCVAPYPSLLS PSQDNIDGEGNT
Canis familiaris	GEHYVHVNATYVNVKCVAPYPSLLS SQDNDIDGEGDT
Pan troglodytes	GEHYVHVNATYVNVKCVAPYPSLLS SSEDNADDEVDTRPASFWETS
Homo sapiens	GEHYVHVNATYVNVKCVAPYPSLLS SSEDNADDEVDTRPASFWETS



A**B****C****D**

A**B****C****D**

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abella, J.V., Peschard, P., Naujokas, M.A., Lin, T., Saucier, C., Urbe, S. and Park, M. (2005) Met/Hepatocyte growth factor receptor ubiquitination suppresses transformation and is required for Hrs phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **25**, 9632-9645.
- Abounader, R., Lal, B., Luddy, C., Koe, G., Davidson, B., Rosen, E.M. and Latterra, J. (2002) In vivo targeting of SF/HGF and c-met expression via U1snRNA/ribozymes inhibits glioma growth and angiogenesis and promotes apoptosis. *Faseb J*, **16**, 108-110.
- Adams, J.M. and Cory, S. (2002) Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 715-720.
- Aebbersold, D.M., Landt, O., Berthou, S., Gruber, G., Beer, K.T., Greiner, R.H. and Zimmer, Y. (2003) Prevalence and clinical impact of Met Y1253D-activating point mutation in radiotherapy-treated squamous cell cancer of the oropharynx. *Oncogene*, **22**, 8519-8523.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. and Mustelin, T. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, **117**, 699-711.
- Andermarcher, E., Surani, M.A. and Gherardi, E. (1996) Co-expression of the HGF/SF and c-met genes during early mouse embryogenesis precedes reciprocal expression in adjacent tissues during organogenesis. *Dev Genet*, **18**, 254-266.
- Arakaki, N., Kajihara, T., Arakaki, R., Ohnishi, T., Kazi, J.A., Nakashima, H. and Daikuhara, Y. (1999) Involvement of oxidative stress in tumor cytotoxic activity of hepatocyte growth factor/scatter factor. *J Biol Chem*, **274**, 13541-13546.
- Atabey, N., Gao, Y., Yao, Z.J., Breckenridge, D., Soon, L., Soriano, J.V., Burke, T.R., Jr. and Bottaro, D.P. (2001) Potent blockade of hepatocyte growth factor-stimulated cell motility, matrix invasion and branching morphogenesis by antagonists of Grb2 Src homology 2 domain interactions. *J Biol Chem*, **276**, 14308-14314.
- Athauda, G., Giubellino, A., Coleman, J.A., Horak, C., Steeg, P.S., Lee, M.J., Trepel, J., Wimberly, J., Sun, J., Coxon, A., Burgess, T.L. and Bottaro, D.P. (2006) c-Met ectodomain shedding rate correlates with malignant potential. *Clin Cancer Res*, **12**, 4154-4162.
- Balkovetz, D.F. and Lipschutz, J.H. (1999) Hepatocyte growth factor and the kidney: it is not just for the liver. *Int Rev Cytol*, **186**, 225-260.

- Bard-Chapeau, E.A., Yuan, J., Droin, N., Long, S., Zhang, E.E., Nguyen, T.V. and Feng, G.S. (2006) Concerted functions of Gab1 and Shp2 in liver regeneration and hepatoprotection. *Mol Cell Biol*, **26**, 4664-4674.
- Bardelli, A., Longati, P., Albero, D., Goruppi, S., Schneider, C., Ponzetto, C. and Comoglio, P.M. (1996) HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *Embo J*, **15**, 6205-6212.
- Bardelli, A., Longati, P., Gramaglia, D., Basilico, C., Tamagnone, L., Giordano, S., Ballinari, D., Michieli, P. and Comoglio, P.M. (1998) Uncoupling signal transducers from oncogenic MET mutants abrogates cell transformation and inhibits invasive growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14379-14383.
- Bardelli, A., Longati, P., Gramaglia, D., Stella, M.C. and Comoglio, P.M. (1997) Gab1 coupling to the HGF/Met receptor multifunctional docking site requires binding of Grb2 and correlates with the transforming potential. *Oncogene*, **15**, 3103-3111.
- Barford, D. and Neel, B.G. (1998) Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Structure*, **6**, 249-254.
- Barros, E.J., Santos, O.F., Matsumoto, K., Nakamura, T. and Nigam, S.K. (1995) Differential tubulogenic and branching morphogenetic activities of growth factors: implications for epithelial tissue development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4412-4416.
- Basile, J.R., Afkhami, T. and Gutkind, J.S. (2005) Semaphorin 4D/plexin-B1 induces endothelial cell migration through the activation of PYK2, Src, and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Mol Cell Biol*, **25**, 6889-6898.
- Belouzard, S. and Rouille, Y. (2006) Ubiquitylation of leptin receptor OB-Ra regulates its clathrin-mediated endocytosis. *Embo J*, **25**, 932-942.
- Berthou, S., Aebersold, D.M., Schmidt, L.S., Stroka, D., Heigl, C., Streit, B., Stalder, D., Gruber, G., Liang, C., Howlett, A.R., Candinas, D., Greiner, R.H., Lipson, K.E. and Zimmer, Y. (2004) The Met kinase inhibitor SU11274 exhibits a selective inhibition pattern toward different receptor mutated variants. *Oncogene*, **23**, 5387-5393.
- Bertotti, A., Comoglio, P.M. and Trusolino, L. (2005) Beta4 integrin is a transforming molecule that unleashes Met tyrosine kinase tumorigenesis. *Cancer Res*, **65**, 10674-10679.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E. and Vande Woude, G.F. (2003) Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 915-925.
- Birchmeier, C. and Gherardi, E. (1998) Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol*, **8**, 404-410.

- Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A. and Birchmeier, C. (1995) Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*, **376**, 768-771.
- Boccaccio, C., Ando, M., Tamagnone, L., Bardelli, A., Michieli, P., Battistini, C. and Comoglio, P.M. (1998) Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature*, **391**, 285-288.
- Boccaccio, C. and Comoglio, P.M. (2006) Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer*, **6**, 637-645.
- Boggon, T.J. and Eck, M.J. (2004) Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*, **23**, 7918-7927.
- Bonazzi, M. and Cossart, P. (2006) Bacterial entry into cells: a role for the endocytic machinery. *FEBS Lett*, **580**, 2962-2967.
- Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M. and Nigg, E.A. (1989) Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*, **56**, 379-390.
- Borowiak, M., Garratt, A.N., Wustefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C. and Birchmeier, C. (2004) Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 10608-10613.
- Bottaro, D.P., Rubin, J.S., Faletto, D.L., Chan, A.M., Kmieciak, T.E., Vande Woude, G.F. and Aaronson, S.A. (1991) Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science*, **251**, 802-804.
- Bourdeau, A., Dube, N. and Tremblay, M.L. (2005) Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 203-209.
- Braun, L., Ohayon, H. and Cossart, P. (1998) The InIB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol Microbiol*, **27**, 1077-1087.
- Brembeck, F.H., Schwarz-Romond, T., Bakkers, J., Wilhelm, S., Hammerschmidt, M. and Birchmeier, W. (2004) Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev*, **18**, 2225-2230.
- Brenner, C. and Kroemer, G. (2000) Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators. *Science*, **289**, 1150-1151.
- Brouillard, P., Boon, L.M., Mulliken, J.B., Enjolras, O., Ghassibe, M., Warman, M.L., Tan, O.T., Olsen, B.R. and Vikkula, M. (2002) Mutations in a novel factor, glomulin, are responsible for glomuvenous malformations ("glomangiomas"). *Am J Hum Genet*, **70**, 866-874.

- Bryant, D.M. and Stow, J.L. (2004) The ins and outs of E-cadherin trafficking. *Trends Cell Biol*, **14**, 427-434.
- Buday, L. (1999) Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1422**, 187-204.
- Bugler, B., Caizergues-Ferrer, M., Bouche, G., Bourbon, H. and Amalric, F. (1982) Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100-kDa nucleolar protein. *Eur J Biochem*, **128**, 475-480.
- Burgess, T., Coxon, A., Meyer, S., Sun, J., Rex, K., Tsuruda, T., Chen, Q., Ho, S.Y., Li, L., Kaufman, S., McDorman, K., Cattley, R.C., Elliott, G., Zhang, K., Feng, X., Jia, X.C., Green, L., Radinsky, R. and Kendall, R. (2006) Fully human monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor with therapeutic potential against hepatocyte growth factor/c-Met-dependent human tumors. *Cancer Res*, **66**, 1721-1729.
- Camp, E.R., Liu, W., Fan, F., Yang, A., Somcio, R. and Ellis, L.M. (2005) RON, a tyrosine kinase receptor involved in tumor progression and metastasis. *Ann Surg Oncol*, **12**, 273-281.
- Cao, B., Su, Y., Oskarsson, M., Zhao, P., Kort, E.J., Fisher, R.J., Wang, L.M. and Vande Woude, G.F. (2001) Neutralizing monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) display antitumor activity in animal models. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7443-7448.
- Carter, S., Urbe, S. and Clague, M.J. (2004) The met receptor degradation pathway: requirement for Lys48-linked polyubiquitin independent of proteasome activity. *J Biol Chem*, **279**, 52835-52839.
- Chan, A.M., Rubin, J.S., Bottaro, D.P., Hirschfield, D.W., Chedid, M. and Aaronson, S.A. (1991) Identification of a competitive HGF antagonist encoded by an alternative transcript. *Science*, **254**, 1382-1385.
- Chan, P.C., Chen, S.Y., Chen, C.H. and Chen, H.C. (2006) Crosstalk between hepatocyte growth factor and integrin signaling pathways. *J Biomed Sci*, **13**, 215-223.
- Chan, P.C., Liang, C.C., Yu, K.C., Chang, M.C., Ho, W.L., Chen, B.H. and Chen, H.C. (2002) Synergistic effect of focal adhesion kinase overexpression and hepatocyte growth factor stimulation on cell transformation. *J Biol Chem*, **277**, 50373-50379.
- Chen, S.Y. and Chen, H.C. (2006) Direct interaction of focal adhesion kinase (FAK) with Met is required for FAK to promote hepatocyte growth factor-induced cell invasion. *Mol Cell Biol*, **26**, 5155-5167.

- Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T. and Korsmeyer, S.J. (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, **8**, 705-711.
- Cheng, H.L., Liu, H.S., Lin, Y.J., Chen, H.H., Hsu, P.Y., Chang, T.Y., Ho, C.L., Tzai, T.S. and Chow, N.H. (2005) Co-expression of RON and MET is a prognostic indicator for patients with transitional-cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer*, **92**, 1906-1914.
- Chiara, F., Michieli, P., Pugliese, L. and Comoglio, P.M. (2003) Mutations in the met oncogene unveil a "dual switch" mechanism controlling tyrosine kinase activity. *J Biol Chem*, **278**, 29352-29358.
- Chodniewicz, D. and Klemke, R.L. (2004) Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold. *Biochim Biophys Acta*, **1692**, 63-76.
- Christensen, J.G., Burrows, J. and Salgia, R. (2005) c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Lett*, **225**, 1-26.
- Christensen, J.G., Schreck, R., Burrows, J., Kuruganti, P., Chan, E., Le, P., Chen, J., Wang, X., Ruslim, L., Blake, R., Lipson, K.E., Ramphal, J., Do, S., Cui, J.J., Cherrington, J.M. and Mendel, D.B. (2003) A selective small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met-dependent phenotypes in vitro and exhibits cytoreductive antitumor activity in vivo. *Cancer Res*, **63**, 7345-7355.
- Cioce, V., Csaky, K.G., Chan, A.M., Bottaro, D.P., Taylor, W.G., Jensen, R., Aaronson, S.A. and Rubin, J.S. (1996) Hepatocyte growth factor (HGF)/NK1 is a naturally occurring HGF/scatter factor variant with partial agonist/antagonist activity. *J Biol Chem*, **271**, 13110-13115.
- Conrotto, P., Corso, S., Gamberini, S., Comoglio, P.M. and Giordano, S. (2004) Interplay between scatter factor receptors and B plexins controls invasive growth. *Oncogene*, **23**, 5131-5137.
- Conrotto, P., Valdembri, D., Corso, S., Serini, G., Tamagnone, L., Comoglio, P.M., Bussolino, F. and Giordano, S. (2005) Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1. *Blood*, **105**, 4321-4329.
- Cooper, C.S., Park, M., Blair, D.G., Tainsky, M.A., Huebner, K., Croce, C.M. and Vande Woude, G.F. (1984) Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature*, **311**, 29-33.
- Cooper, L.A., Shen, T.L. and Guan, J.L. (2003) Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. *Mol Cell Biol*, **23**, 8030-8041.

- Copp, J., Marino, M., Banerjee, M., Ghosh, P. and van der Geer, P. (2003) Multiple regions of internalin B contribute to its ability to turn on the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*, **278**, 7783-7789.
- Cornillon, J., Campos, L. and Guyotat, D. (2003) [Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]. *Med Sci (Paris)*, **19**, 743-752.
- Corso, S., Comoglio, P.M. and Giordano, S. (2005) Cancer therapy: can the challenge be MET? *Trends Mol Med*, **11**, 284-292.
- Cossart, P. (2001) Met, the HGF-SF receptor: another receptor for *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol*, **9**, 105-107.
- Cramer, A., Kleiner, S., Westermann, M., Meissner, A., Lange, A. and Friedrich, K. (2005) Activation of the c-Met receptor complex in fibroblasts drives invasive cell behavior by signaling through transcription factor STAT3. *J Cell Biochem*, **95**, 805-816.
- Crepaldi, T., Prat, M., Giordano, S., Medico, E. and Comoglio, P.M. (1994) Generation of a truncated hepatocyte growth factor receptor in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **269**, 1750-1755.
- Cristiani, C., Rusconi, L., Perego, R., Schiering, N., Kalisz, H.M., Knapp, S. and Isacchi, A. (2005) Regulation of the wild-type and Y1235D mutant Met kinase activation. *Biochemistry*, **44**, 14110-14119.
- Cunnick, J.M., Mei, L., Doupnik, C.A. and Wu, J. (2001) Phosphotyrosines 627 and 659 of Gab1 constitute a bisphosphoryl tyrosine-based activation motif (BTAM) conferring binding and activation of SHP2. *J Biol Chem*, **276**, 24380-24387.
- Cunnick, J.M., Meng, S., Ren, Y., Desponts, C., Wang, H.G., Djeu, J.Y. and Wu, J. (2002) Regulation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway by SHP2. *J Biol Chem*, **277**, 9498-9504.
- Date, K., Matsumoto, K., Shimura, H., Tanaka, M. and Nakamura, T. (1997) HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor. *FEBS Lett*, **420**, 1-6.
- de Mol, N.J., Catalina, M.I., Fischer, M.J., Broutin, I., Maier, C.S. and Heck, A.J. (2004) Changes in structural dynamics of the Grb2 adaptor protein upon binding of phosphotyrosine ligand to its SH2 domain. *Biochim Biophys Acta*, **1700**, 53-64.
- de Vos, A.M., Ultsch, M. and Kossiakoff, A.A. (1992) Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science*, **255**, 306-312.

- Deakin, J.A. and Lyon, M. (1999) Differential regulation of hepatocyte growth factor/scatter factor by cell surface proteoglycans and free glycosaminoglycan chains. *J Cell Sci*, **112 (Pt 12)**, 1999-2009.
- Denti, S., Sirri, A., Cheli, A., Rogge, L., Innamorati, G., Putignano, S., Fabbri, M., Pardi, R. and Bianchi, E. (2004) RanBPM is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin LFA-1. *J Biol Chem*, **279**, 13027-13034.
- Derenzini, M., Sirri, V., Trere, D. and Ochs, R.L. (1995) The quantity of nucleolar proteins nucleolin and protein B23 is related to cell doubling time in human cancer cells. *Lab Invest*, **73**, 497-502.
- Dharmawardana, P.G., Peruzzi, B., Giubellino, A., Burke, T.R., Jr. and Bottaro, D.P. (2006) Molecular targeting of growth factor receptor-bound 2 (Grb2) as an anti-cancer strategy. *Anticancer Drugs*, **17**, 13-20.
- Di Renzo, M.F., Olivero, M., Giacomini, A., Porte, H., Chastre, E., Mirossay, L., Nordlinger, B., Bretti, S., Bottardi, S., Giordano, S. and et al. (1995) Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, **1**, 147-154.
- Di Renzo, M.F., Olivero, M., Martone, T., Maffe, A., Maggiora, P., Stefani, A.D., Valente, G., Giordano, S., Cortesina, G. and Comoglio, P.M. (2000) Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. *Oncogene*, **19**, 1547-1555.
- Dramsı, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P. and Cossart, P. (1995) Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol*, **16**, 251-261.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, **102**, 33-42.
- Eguchi, S., Kamlot, A., Ljubimova, J., Hewitt, W.R., Lebow, L.T., Demetriou, A.A. and Rozga, J. (1996) Fulminant hepatic failure in rats: survival and effect on blood chemistry and liver regeneration. *Hepatology*, **24**, 1452-1459.
- Fadeel, B., Zhivotovsky, B. and Orrenius, S. (1999) All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. *Faseb J*, **13**, 1647-1657.
- Fafeur, V., Tulasne, D., Queva, C., Vercamer, C., Dimster, V., Mattot, V., Stehelin, D., Desbiens, X. and Vandenbunder, B. (1997) The ETS1 transcription factor is expressed

- during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter factor-stimulated MDCK epithelial cells. *Cell Growth Differ*, **8**, 655-665.
- Fan, S., Ma, Y.X., Gao, M., Yuan, R.Q., Meng, Q., Goldberg, I.D. and Rosen, E.M. (2001) The multisubstrate adapter Gab1 regulates hepatocyte growth factor (scatter factor)-c-Met signaling for cell survival and DNA repair. *Mol Cell Biol*, **21**, 4968-4984.
- Fan, S., Ma, Y.X., Wang, J.A., Yuan, R.Q., Meng, Q., Cao, Y., Laterra, J.J., Goldberg, I.D. and Rosen, E.M. (2000) The cytokine hepatocyte growth factor/scatter factor inhibits apoptosis and enhances DNA repair by a common mechanism involving signaling through phosphatidylinositol 3' kinase. *Oncogene*, **19**, 2212-2223.
- Ferracini, R., Longati, P., Naldini, L., Vigna, E. and Comoglio, P.M. (1991) Identification of the major autophosphorylation site of the Met/hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, **266**, 19558-19564.
- Firon, M., Shaharabany, M., Altstock, R.T., Horev, J., Abramovici, A., Resau, J.H., Vande Woude, G.F. and Tsarfaty, I. (2000) Dominant negative Met reduces tumorigenicity-metastasis and increases tubule formation in mammary cells. *Oncogene*, **19**, 2386-2397.
- Fischer, O.M., Giordano, S., Comoglio, P.M. and Ullrich, A. (2004) Reactive oxygen species mediate Met receptor transactivation by G protein-coupled receptors and the epidermal growth factor receptor in human carcinoma cells. *J Biol Chem*, **279**, 28970-28978.
- Fischer, U., Janicke, R.U. and Schulze-Osthoff, K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, **10**, 76-100.
- Fixman, E.D., Holgado-Madruga, M., Nguyen, L., Kamikura, D.M., Fournier, T.M., Wong, A.J. and Park, M. (1997) Efficient cellular transformation by the Met oncoprotein requires a functional Grb2 binding site and correlates with phosphorylation of the Grb2-associated proteins, Cbl and Gab1. *J Biol Chem*, **272**, 20167-20172.
- Follenzi, A., Bakovic, S., Gual, P., Stella, M.C., Longati, P. and Comoglio, P.M. (2000) Cross-talk between the proto-oncogenes Met and Ron. *Oncogene*, **19**, 3041-3049.
- Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C. and Gonzalez-Baron, M. (2004) PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*, **30**, 193-204.
- Frisch, S.M. and Ruoslahti, E. (1997) Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 701-706.
- Furge, K.A., Kiewlich, D., Le, P., Vo, M.N., Faure, M., Howlett, A.R., Lipson, K.E., Woude, G.F. and Webb, C.P. (2001) Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and

- metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10722-10727.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. and Cossart, P. (1991) Entry of L. monocytogenes into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell*, **65**, 1127-1141.
- Gak, E., Taylor, W.G., Chan, A.M. and Rubin, J.S. (1992) Processing of hepatocyte growth factor to the heterodimeric form is required for biological activity. *FEBS Lett*, **311**, 17-21.
- Gallagher, J.T. and Walker, A. (1985) Molecular distinctions between heparan sulphate and heparin. Analysis of sulphation patterns indicates that heparan sulphate and heparin are separate families of N-sulphated polysaccharides. *Biochem J*, **230**, 665-674.
- Gandino, L., Longati, P., Medico, E., Prat, M. and Comoglio, P.M. (1994) Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *J Biol Chem*, **269**, 1815-1820.
- Garbay, C., Liu, W.Q., Vidal, M. and Roques, B.P. (2000) Inhibitors of Ras signal transduction as antitumor agents. *Biochem Pharmacol*, **60**, 1165-1169.
- Garcia-Guzman, M., Dolfi, F., Zeh, K. and Vuori, K. (1999) Met-induced JNK activation is mediated by the adapter protein Crk and correlates with the Gab1 - Crk signaling complex formation. *Oncogene*, **18**, 7775-7786.
- Gaudino, G., Avantaggiato, V., Follenzi, A., Acampora, D., Simeone, A. and Comoglio, P.M. (1995) The proto-oncogene RON is involved in development of epithelial, bone and neuro-endocrine tissues. *Oncogene*, **11**, 2627-2637.
- Gaudino, G., Follenzi, A., Naldini, L., Collesi, C., Santoro, M., Gallo, K.A., Godowski, P.J. and Comoglio, P.M. (1994) RON is a heterodimeric tyrosine kinase receptor activated by the HGF homologue MSP. *Embo J*, **13**, 3524-3532.
- Gherardi, E., Love, C.A., Esnouf, R.M. and Jones, E.Y. (2004) The sema domain. *Curr Opin Struct Biol*, **14**, 669-678.
- Gherardi, E., Sandin, S., Petoukhov, M.V., Finch, J., Youles, M.E., Ofverstedt, L.G., Miguel, R.N., Blundell, T.L., Vande Woude, G.F., Skoglund, U. and Svergun, D.I. (2006) Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 4046-4051.
- Gherardi, E., Youles, M.E., Miguel, R.N., Blundell, T.L., Iamele, L., Gough, J., Bandyopadhyay, A., Hartmann, G. and Butler, P.J. (2003) Functional map and domain

- structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12039-12044.
- Giancotti, F.G. and Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. *Science*, **285**, 1028-1032.
- Giordano, S., Corso, S., Conrotto, P., Artigiani, S., Gilestro, G., Barberis, D., Tamagnone, L. and Comoglio, P.M. (2002) The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat Cell Biol*, **4**, 720-724.
- Giordano, S., Maffe, A., Williams, T.A., Artigiani, S., Gual, P., Bardelli, A., Basilico, C., Michieli, P. and Comoglio, P.M. (2000) Different point mutations in the met oncogene elicit distinct biological properties. *Faseb J*, **14**, 399-406.
- Gohda, E., Matsunaga, T., Kataoka, H., Takebe, T. and Yamamoto, I. (1994) Induction of hepatocyte growth factor in human skin fibroblasts by epidermal growth factor, platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor. *Cytokine*, **6**, 633-640.
- Goudreau, N., Cornille, F., Duchesne, M., Parker, F., Tocque, B., Garbay, C. and Roques, B.P. (1994) NMR structure of the N-terminal SH3 domain of GRB2 and its complex with a proline-rich peptide from Sos. *Nat Struct Biol*, **1**, 898-907.
- Gouin, E., Welch, M.D. and Cossart, P. (2005) Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr Opin Microbiol*, **8**, 35-45.
- Graveel, C., Su, Y., Koeman, J., Wang, L.M., Tessarollo, L., Fiscella, M., Birchmeier, C., Swiatek, P., Bronson, R. and Vande Woude, G. (2004) Activating Met mutations produce unique tumor profiles in mice with selective duplication of the mutant allele. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 17198-17203.
- Graveel, C.R., London, C.A. and Vande Woude, G.F. (2005) A mouse model of activating Met mutations. *Cell Cycle*, **4**, 518-520.
- Green, D.R. and Kroemer, G. (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, **305**, 626-629.
- Grisendi, S., Chambraud, B., Gout, I., Comoglio, P.M. and Crepaldi, T. (2001) Ligand-regulated binding of FAP68 to the hepatocyte growth factor receptor. *J Biol Chem*, **276**, 46632-46638.
- Gu, H., Maeda, H., Moon, J.J., Lord, J.D., Yoakim, M., Nelson, B.H. and Neel, B.G. (2000) New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Mol Cell Biol*, **20**, 7109-7120.
- Gual, P., Giordano, S., Williams, T.A., Rocchi, S., Van Obberghen, E. and Comoglio, P.M. (2000) Sustained recruitment of phospholipase C-gamma to Gab1 is required for HGF-induced branching tubulogenesis. *Oncogene*, **19**, 1509-1518.

- Hafizi, S., Gustafsson, A., Stenhoff, J. and Dahlback, B. (2005) The Ran binding protein RanBPM interacts with Axl and Sky receptor tyrosine kinases. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 2344-2356.
- Haines, L., Neyt, C., Gautier, P., Keenan, D.G., Bryson-Richardson, R.J., Hollway, G.E., Cole, N.J. and Currie, P.D. (2004) Met and Hgf signaling controls hypaxial muscle and lateral line development in the zebrafish. *Development*, **131**, 4857-4869.
- Hamanoue, M., Kawaida, K., Takao, S., Shimazu, H., Noji, S., Matsumoto, K. and Nakamura, T. (1992) Rapid and marked induction of hepatocyte growth factor during liver regeneration after ischemic or crush injury. *Hepatology*, **16**, 1485-1492.
- Han, J., Tsukada, Y., Hara, E., Kitamura, N. and Tanaka, T. (2005) Hepatocyte growth factor induces redistribution of p21(CIP1) and p27(KIP1) through ERK-dependent p16(INK4a) up-regulation, leading to cell cycle arrest at G1 in HepG2 hepatoma cells. *J Biol Chem*, **280**, 31548-31556.
- Hara, S., Nakashiro, K., Klosek, S.K., Ishikawa, T., Shintani, S. and Hamakawa, H. (2006) Hypoxia enhances c-Met/HGF receptor expression and signaling by activating HIF-1alpha in human salivary gland cancer cells. *Oral Oncol*, **42**, 593-598.
- Harrison, S.C. (2003) Variation on an Src-like theme. *Cell*, **112**, 737-740.
- Hartmann, G., Naldini, L., Weidner, K.M., Sachs, M., Vigna, E., Comoglio, P.M. and Birchmeier, W. (1992) A functional domain in the heavy chain of scatter factor/hepatocyte growth factor binds the c-Met receptor and induces cell dissociation but not mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 11574-11578.
- Hashigasako, A., Machide, M., Nakamura, T. and Matsumoto, K. (2004) Bi-directional regulation of Ser-985 phosphorylation of c-met via protein kinase C and protein phosphatase 2A involves c-Met activation and cellular responsiveness to hepatocyte growth factor. *J Biol Chem*, **279**, 26445-26452.
- Hayman, M.J., Kitchener, G., Vogt, P.K. and Beug, H. (1985) The putative transforming protein of S13 avian erythroblastosis virus is a transmembrane glycoprotein with an associated protein kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 8237-8241.
- Higashio, K. and Shima, N. (1993) Tumor cytotoxic activity of HGF-SF. *Exs*, **65**, 351-368.
- Hildebrand, J.D., Schaller, M.D. and Parsons, J.T. (1993) Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. *J Cell Biol*, **123**, 993-1005.

- Hiscox, S. and Jiang, W.G. (1999) Association of the HGF/SF receptor, c-met, with the cell-surface adhesion molecule, E-cadherin, and catenins in human tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **261**, 406-411.
- Holgado-Madruga, M., Moscatello, D.K., Emler, D.R., Dieterich, R. and Wong, A.J. (1997) Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12419-12424.
- Horvitz, H.R. (1999) Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res*, **59**, 1701s-1706s.
- Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S. and Sorkin, A. (2006) Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol Cell*, **21**, 737-748.
- Huh, C.G., Factor, V.M., Sanchez, A., Uchida, K., Conner, E.A. and Thorgeirsson, S.S. (2004) Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4477-4482.
- Hynes, R.O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, **110**, 673-687.
- Ieraci, A., Forni, P.E. and Ponzetto, C. (2002) Viable hypomorphic signaling mutant of the Met receptor reveals a role for hepatocyte growth factor in postnatal cerebellar development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 15200-15205.
- Itoh, M., Yoshida, Y., Nishida, K., Narimatsu, M., Hibi, M. and Hirano, T. (2000) Role of Gab1 in heart, placenta, and skin development and growth factor- and cytokine-induced extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase activation. *Mol Cell Biol*, **20**, 3695-3704.
- Iwama, A., Wang, M.H., Yamaguchi, N., Ohno, N., Okano, K., Sudo, T., Takeya, M., Gervais, F., Morissette, C., Leonard, E.J. and Suda, T. (1995) Terminal differentiation of murine resident peritoneal macrophages is characterized by expression of the STK protein tyrosine kinase, a receptor for macrophage-stimulating protein. *Blood*, **86**, 3394-3403.
- Jagadeeswaran, R., Ma, P.C., Seiwert, T.Y., Jagadeeswaran, S., Zumba, O., Nallasura, V., Ahmed, S., Filiberti, R., Paganuzzi, M., Puntoni, R., Kratzke, R.A., Gordon, G.J., Sugarbaker, D.J., Bueno, R., Janamanchi, V., Bindokas, V.P., Kindler, H.L. and Salgia, R. (2006) Functional analysis of c-Met/hepatocyte growth factor pathway in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res*, **66**, 352-361.

- Jeffers, M., Schmidt, L., Nakaigawa, N., Webb, C.P., Weirich, G., Kishida, T., Zbar, B. and Vande Woude, G.F. (1997a) Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11445-11450.
- Jeffers, M., Taylor, G.A., Weidner, K.M., Omura, S. and Vande Woude, G.F. (1997b) Degradation of the Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol*, **17**, 799-808.
- Jeffers, M.F. (1999) Activating mutations in the Met receptor overcome the requirement for autophosphorylation of tyrosines crucial for wild type signaling. *Oncogene*, **18**, 5120-5125.
- Jiang, W.G., Grimshaw, D., Martin, T.A., Davies, G., Parr, C., Watkins, G., Lane, J., Abounader, R., Laterra, J. and Mansel, R.E. (2003) Reduction of stromal fibroblast-induced mammary tumor growth, by retroviral ribozyme transgenes to hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, c-MET. *Clin Cancer Res*, **9**, 4274-4281.
- Jo, M., Stolz, D.B., Esplen, J.E., Dorko, K., Michalopoulos, G.K. and Strom, S.C. (2000) Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *J Biol Chem*, **275**, 8806-8811.
- Jordan, M.S., Singer, A.L. and Koretzky, G.A. (2003) Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. *Nat Immunol*, **4**, 110-116.
- Kameda, H., Risinger, J.I., Han, B.B., Baek, S.J., Barrett, J.C., Abe, T., Takeuchi, T., Glasgow, W.C. and Eling, T.E. (2001) Expression of Gab1 lacking the pleckstrin homology domain is associated with neoplastic progression. *Mol Cell Biol*, **21**, 6895-6905.
- Kamei, T., Matozaki, T., Sakisaka, T., Kodama, A., Yokoyama, S., Peng, Y.F., Nakano, K., Takaishi, K. and Takai, Y. (1999) Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells--regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins. *Oncogene*, **18**, 6776-6784.
- Kataoka, H., Miyata, S., Uchinokura, S. and Itoh, H. (2003) Roles of hepatocyte growth factor (HGF) activator and HGF activator inhibitor in the pericellular activation of HGF/scatter factor. *Cancer Metastasis Rev*, **22**, 223-236.
- Kawaida, K., Matsumoto, K., Shimazu, H. and Nakamura, T. (1994) Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4357-4361.
- Kemp, L.E., Mulloy, B. and Gherardi, E. (2006) Signalling by HGF/SF and Met: the role of heparan sulphate co-receptors. *Biochem Soc Trans*, **34**, 414-417.

- Kermorgant, S. and Parker, P.J. (2005) c-Met signalling: spatio-temporal decisions. *Cell Cycle*, **4**, 352-355.
- Kermorgant, S., Zicha, D. and Parker, P.J. (2003) Protein kinase C controls microtubule-based traffic but not proteasomal degradation of c-Met. *J Biol Chem*, **278**, 28921-28929.
- Kermorgant, S., Zicha, D. and Parker, P.J. (2004) PKC controls HGF-dependent c-Met traffic, signalling and cell migration. *Embo J*, **23**, 3721-3734.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-257.
- Kijima, Y., Hokita, S., Yoshinaka, H., Itoh, T., Koriyama, C., Eizuru, Y., Akiba, S. and Aikou, T. (2002) Amplification and overexpression of c-met gene in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. *Oncology*, **62**, 60-65.
- Kim, I.J., Park, J.H., Kang, H.C., Shin, Y., Lim, S.B., Ku, J.L., Yang, H.K., Lee, K.U. and Park, J.G. (2003) A novel germline mutation in the MET extracellular domain in a Korean patient with the diffuse type of familial gastric cancer. *J Med Genet*, **40**, e97.
- Kim, K.J., Wang, L., Su, Y.C., Gillespie, G.Y., Salhotra, A., Lal, B. and Lattera, J. (2006) Systemic anti-hepatocyte growth factor monoclonal antibody therapy induces the regression of intracranial glioma xenografts. *Clin Cancer Res*, **12**, 1292-1298.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*, **14**, 5579-5588.
- Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Sugimura, H., Kurata, T. and Matsuda, M. (1998) Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev*, **12**, 3331-3336.
- Klosek, S.K., Nakashiro, K., Hara, S., Li, C., Shintani, S. and Hamakawa, H. (2004) Constitutive activation of Stat3 correlates with increased expression of the c-Met/HGF receptor in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, **12**, 293-296.
- Koch, A., Mancini, A., El Bounkari, O. and Tamura, T. (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**, 3436-3447.

- Komada, M., Hatsuzawa, K., Shibamoto, S., Ito, F., Nakayama, K. and Kitamura, N. (1993) Proteolytic processing of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor by furin. *FEBS Lett*, **328**, 25-29.
- Komada, M. and Kitamura, N. (1995) Growth factor-induced tyrosine phosphorylation of Hrs, a novel 115-kilodalton protein with a structurally conserved putative zinc finger domain. *Mol Cell Biol*, **15**, 6213-6221.
- Komada, M. and Kitamura, N. (2005) The Hrs/STAM complex in the downregulation of receptor tyrosine kinases. *J Biochem (Tokyo)*, **137**, 1-8.
- Kong-Beltran, M., Seshagiri, S., Zha, J., Zhu, W., Bhawe, K., Mendoza, N., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Fu, L., Severin, C., Rangell, L., Schwall, R., Amler, L., Wickramasinghe, D. and Yauch, R. (2006) Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer Res*, **66**, 283-289.
- Kong-Beltran, M., Stamos, J. and Wickramasinghe, D. (2004) The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation. *Cancer Cell*, **6**, 75-84.
- Koretzky, G.A. (1997) The role of Grb2-associated proteins in T-cell activation. *Immunol Today*, **18**, 401-406.
- Kozlov, G., Perreault, A., Schrag, J.D., Park, M., Cygler, M., Gehring, K. and Ekiel, I. (2004) Insights into function of PSI domains from structure of the Met receptor PSI domain. *Biochem Biophys Res Commun*, **321**, 234-240.
- Kruger, R.P., Aurandt, J. and Guan, K.L. (2005) Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 789-800.
- Kuniyasu, H., Yasui, W., Kitadai, Y., Yokozaki, H., Ito, H. and Tahara, E. (1992) Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, **189**, 227-232.
- Lai, J.F., Kao, S.C., Jiang, S.T., Tang, M.J., Chan, P.C. and Chen, H.C. (2000) Involvement of focal adhesion kinase in hepatocyte growth factor-induced scatter of Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*, **275**, 7474-7480.
- Larrucea, S., Gonzalez-Rubio, C., Cambronero, R., Ballou, B., Bonay, P., Lopez-Granados, E., Bouvet, P., Fontan, G., Fresno, M. and Lopez-Trascasa, M. (1998) Cellular adhesion mediated by factor J, a complement inhibitor. Evidence for nucleolin involvement. *J Biol Chem*, **273**, 31718-31725.
- Lecuit, M. (2005) Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. *Clin Microbiol Infect*, **11**, 430-436.

- Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J. and Cossart, P. (1997) Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun*, **65**, 5309-5319.
- Lee, C.C. and Yamada, K.M. (1994) Identification of a novel type of alternative splicing of a tyrosine kinase receptor. Juxtamembrane deletion of the c-met protein kinase C serine phosphorylation regulatory site. *J Biol Chem*, **269**, 19457-19461.
- Lee, C.C. and Yamada, K.M. (1995) Alternatively spliced juxtamembrane domain of a tyrosine kinase receptor is a multifunctional regulatory site. Deletion alters cellular tyrosine phosphorylation pattern and facilitates binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to the hepatocyte growth factor receptor. *J Biol Chem*, **270**, 507-510.
- Lee, J.H., Han, S.U., Cho, H., Jennings, B., Gerrard, B., Dean, M., Schmidt, L., Zbar, B. and Vande Woude, G.F. (2000) A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer. *Oncogene*, **19**, 4947-4953.
- Lee, W.Y., Chen, H.H., Chow, N.H., Su, W.C., Lin, P.W. and Guo, H.R. (2005) Prognostic significance of co-expression of RON and MET receptors in node-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, **11**, 2222-2228.
- Lehr, S., Kotzka, J., Avci, H., Sickmann, A., Meyer, H.E., Herkner, A. and Muller-Wieland, D. (2004) Identification of major ERK-related phosphorylation sites in Gab1. *Biochemistry*, **43**, 12133-12140.
- Levy, D.E. and Darnell, J.E., Jr. (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 651-662.
- Levy, D.E. and Lee, C.K. (2002) What does Stat3 do? *J Clin Invest*, **109**, 1143-1148.
- Li, L.Y., Luo, X. and Wang, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, **412**, 95-99.
- Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B. and Schlessinger, J. (1993) Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature*, **363**, 85-88.
- Liao, A.T., McMahon, M. and London, C.A. (2006) Identification of a novel germline MET mutation in dogs. *Anim Genet*, **37**, 248-252.
- Lietha, D., Chirgadze, D.Y., Mulloy, B., Blundell, T.L. and Gherardi, E. (2001) Crystal structures of NK1-heparin complexes reveal the basis for NK1 activity and enable engineering of potent agonists of the MET receptor. *Embo J*, **20**, 5543-5555.

- Liou, G.I., Matragoon, S., Samuel, S., Behzadian, M.A., Tsai, N.T., Gu, X., Roon, P., Hunt, D.M., Hunt, R.C., Caldwell, R.B. and Marcus, D.M. (2002) MAP kinase and beta-catenin signaling in HGF induced RPE migration. *Mol Vis*, **8**, 483-493.
- Liu, Y. and Rohrschneider, L.R. (2002) The gift of Gab. *FEBS Lett*, **515**, 1-7.
- Lock, L.S., Frigault, M.M., Saucier, C. and Park, M. (2003) Grb2-independent recruitment of Gab1 requires the C-terminal lobe and structural integrity of the Met receptor kinase domain. *J Biol Chem*, **278**, 30083-30090.
- Lock, L.S., Royal, I., Naujokas, M.A. and Park, M. (2000) Identification of an atypical Grb2 carboxyl-terminal SH3 domain binding site in Gab docking proteins reveals Grb2-dependent and -independent recruitment of Gab1 to receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*, **275**, 31536-31545.
- Lockshin, R.A. and Williams, C.M. (1965) Programmed Cell Death--I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkworm. *J Insect Physiol*, **11**, 123-133.
- Lokker, N.A., Mark, M.R., Luis, E.A., Bennett, G.L., Robbins, K.A., Baker, J.B. and Godowski, P.J. (1992) Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *Embo J*, **11**, 2503-2510.
- Longati, P., Bardelli, A., Ponzetto, C., Naldini, L. and Comoglio, P.M. (1994) Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene*, **9**, 49-57.
- Lorenzato, A., Olivero, M., Patane, S., Rosso, E., Oliaro, A., Comoglio, P.M. and Di Renzo, M.F. (2002) Novel somatic mutations of the MET oncogene in human carcinoma metastases activating cell motility and invasion. *Cancer Res*, **62**, 7025-7030.
- Lyon, M., Deakin, J.A. and Gallagher, J.T. (2002) The mode of action of heparan and dermatan sulfates in the regulation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *J Biol Chem*, **277**, 1040-1046.
- Lyon, M., Deakin, J.A., Rahmoune, H., Fernig, D.G., Nakamura, T. and Gallagher, J.T. (1998) Hepatocyte growth factor/scatter factor binds with high affinity to dermatan sulfate. *J Biol Chem*, **273**, 271-278.
- Ma, P.C., Kijima, T., Maulik, G., Fox, E.A., Sattler, M., Griffin, J.D., Johnson, B.E. and Salgia, R. (2003) c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res*, **63**, 6272-6281.

- Machide, M., Hashigasako, A., Matsumoto, K. and Nakamura, T. (2006) Contact inhibition of hepatocyte growth regulated by functional association of the c-Met/hepatocyte growth factor receptor and LAR protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem*, **281**, 8765-8772.
- Maggiore, P., Lorenzato, A., Fracchioli, S., Costa, B., Castagnaro, M., Arisio, R., Katsaros, D., Massobrio, M., Comoglio, P.M. and Flavia Di Renzo, M. (2003) The RON and MET oncogenes are co-expressed in human ovarian carcinomas and cooperate in activating invasiveness. *Exp Cell Res*, **288**, 382-389.
- Maignan, S., Guilloteau, J.P., Fromage, N., Arnoux, B., Becquart, J. and Ducruix, A. (1995) Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor. *Science*, **268**, 291-293.
- Maina, F., Hilton, M.C., Ponzetto, C., Davies, A.M. and Klein, R. (1997) Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes Dev*, **11**, 3341-3350.
- Maina, F. and Klein, R. (1999) Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nat Neurosci*, **2**, 213-217.
- Mancini, A., Koch, A., Wilms, R. and Tamura, T. (2002) The SH2-containing inositol 5-phosphatase (SHIP)-1 is implicated in the control of cell-cell junction and induces dissociation and dispersion of MDCK cells. *Oncogene*, **21**, 1477-1484.
- Marchetti, P. (2005) [Apoptosis: basic knowledge and applications]. *Gynecol Obstet Fertil*, **33**, 632-641.
- Maritano, D., Accornero, P., Bonifaci, N. and Ponzetto, C. (2000) Two mutations affecting conserved residues in the Met receptor operate via different mechanisms. *Oncogene*, **19**, 1354-1361.
- Maroun, C.R., Holgado-Madruga, M., Royal, I., Naujokas, M.A., Fournier, T.M., Wong, A.J. and Park, M. (1999a) 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. *Mol Cell Biol*, **19**, 1784-1799.
- Maroun, C.R., Moscatello, D.K., Naujokas, M.A., Holgado-Madruga, M., Wong, A.J. and Park, M. (1999b) A conserved inositol phospholipid binding site within the pleckstrin homology domain of the Gab1 docking protein is required for epithelial morphogenesis. *J Biol Chem*, **274**, 31719-31726.
- Maroun, C.R., Naujokas, M.A., Holgado-Madruga, M., Wong, A.J. and Park, M. (2000) The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*, **20**, 8513-8525.

- Maroun, C.R., Naujokas, M.A. and Park, M. (2003) Membrane targeting of Grb2-associated binder-1 (Gab1) scaffolding protein through Src myristoylation sequence substitutes for Gab1 pleckstrin homology domain and switches an epidermal growth factor response to an invasive morphogenic program. *Mol Biol Cell*, **14**, 1691-1708.
- Matsumoto, K. and Nakamura, T. (2005) Mechanisms and significance of bifunctional NK4 in cancer treatment. *Biochem Biophys Res Commun*, **333**, 316-327.
- Matzke, A., Herrlich, P., Ponta, H. and Orian-Rousseau, V. (2005) A five-amino-acid peptide blocks Met- and Ron-dependent cell migration. *Cancer Res*, **65**, 6105-6110.
- Maulik, G., Madhiwala, P., Brooks, S., Ma, P.C., Kijima, T., Tibaldi, E.V., Schaefer, E., Parmar, K. and Salgia, R. (2002) Activated c-Met signals through PI3K with dramatic effects on cytoskeletal functions in small cell lung cancer. *J Cell Mol Med*, **6**, 539-553.
- Mazzone, M., Basilico, C., Cavassa, S., Pennacchietti, S., Risio, M., Naldini, L., Comoglio, P.M. and Michieli, P. (2004) An uncleavable form of pro-scatter factor suppresses tumor growth and dissemination in mice. *J Clin Invest*, **114**, 1418-1432.
- McIntyre, B.A., Brouillard, P., Aerts, V., Gutierrez-Roelens, I. and Vikkula, M. (2004) Glomulin is predominantly expressed in vascular smooth muscle cells in the embryonic and adult mouse. *Gene Expr Patterns*, **4**, 351-358.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.M. and Cossart, P. (1996) E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell*, **84**, 923-932.
- Mercurio, A.M. and Rabinovitz, I. (2001) Towards a mechanistic understanding of tumor invasion--lessons from the alpha6beta 4 integrin. *Semin Cancer Biol*, **11**, 129-141.
- Mi, Y., Thomas, S.D., Xu, X., Casson, L.K., Miller, D.M. and Bates, P.J. (2003) Apoptosis in leukemia cells is accompanied by alterations in the levels and localization of nucleolin. *J Biol Chem*, **278**, 8572-8579.
- Michieli, P., Mazzone, M., Basilico, C., Cavassa, S., Sottile, A., Naldini, L. and Comoglio, P.M. (2004) Targeting the tumor and its microenvironment by a dual-function decoy Met receptor. *Cancer Cell*, **6**, 61-73.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A. and Schlaepfer, D.D. (2005) Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 56-68.
- Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y. and Kitamura, N. (1993) Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of

- the protease precursor to blood coagulation factor XII. *J Biol Chem*, **268**, 10024-10028.
- Mizuno, K. and Nakamura, T. (1993) Molecular characteristics of HGF and the gene, and its biochemical aspects. *Exs*, **65**, 1-29.
- Moghul, A., Lin, L., Beedle, A., Kanbour-Shakir, A., DeFrances, M.C., Liu, Y. and Zarnegar, R. (1994) Modulation of c-MET proto-oncogene (HGF receptor) mRNA abundance by cytokines and hormones: evidence for rapid decay of the 8 kb c-MET transcript. *Oncogene*, **9**, 2045-2052.
- Monga, S.P., Mars, W.M., Padiaditakis, P., Bell, A., Mule, K., Bowen, W.C., Wang, X., Zarnegar, R. and Michalopoulos, G.K. (2002) Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of beta-catenin after Met-beta-catenin dissociation in hepatocytes. *Cancer Res*, **62**, 2064-2071.
- Montagner, A., Yart, A., Dance, M., Perret, B., Salles, J.P. and Raynal, P. (2005) A novel role for Gab1 and SHP2 in epidermal growth factor-induced Ras activation. *J Biol Chem*, **280**, 5350-5360.
- Mood, K., Saucier, C., Bong, Y.S., Lee, H.S., Park, M. and Daar, I.O. (2006) Gab1 Is Required for Cell-Cycle Transition, Cell Proliferation, and Transformation Induced by an Oncogenic Met Receptor. *Mol Biol Cell*.
- Moon, Y.W., Weil, R.J., Pack, S.D., Park, W.S., Pak, E., Pham, T., Karkera, J.D., Kim, H.K., Vortmeyer, A.O., Fuller, B.G. and Zhuang, Z. (2000) Missense mutation of the MET gene detected in human glioma. *Mod Pathol*, **13**, 973-977.
- Morotti, A., Mila, S., Accornero, P., Tagliabue, E. and Ponzetto, C. (2002) K252a inhibits the oncogenic properties of Met, the HGF receptor. *Oncogene*, **21**, 4885-4893.
- Muraoka, R.S., Sun, W.Y., Colbert, M.C., Waltz, S.E., Witte, D.P., Degen, J.L. and Friezner Degen, S.J. (1999) The Ron/STK receptor tyrosine kinase is essential for peri-implantation development in the mouse. *J Clin Invest*, **103**, 1277-1285.
- Nagata, S. (1999) Biddable death. *Nat Cell Biol*, **1**, E143-145.
- Naka, D., Ishii, T., Yoshiyama, Y., Miyazawa, K., Hara, H., Hishida, T. and Kidamura, N. (1992) Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of a single chain form to a heterodimer. *J Biol Chem*, **267**, 20114-20119.
- Nakagami, H., Morishita, R., Nishikawa, T., Shimizu, H., Iguchi, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda, Y. and Ogihara, T. (2004) Lack of association between the hepatocyte growth factor receptor, c-met, and the anti-apoptotic action of bag-1 in endothelial cells. *Hypertens Res*, **27**, 359-365.

- Nakaigawa, N., Weirich, G., Schmidt, L. and Zbar, B. (2000) Tumorigenesis mediated by MET mutant M1268T is inhibited by dominant-negative Src. *Oncogene*, **19**, 2996-3002.
- Nakamura, T. (1991) Structure and function of hepatocyte growth factor. *Prog Growth Factor Res*, **3**, 67-85.
- Nakamura, T., Nawa, K. and Ichihara, A. (1984) Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **122**, 1450-1459.
- Naldini, L., Tamagnone, L., Vigna, E., Sachs, M., Hartmann, G., Birchmeier, W., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Blasi, F. and Comoglio, P.M. (1992) Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *Embo J*, **11**, 4825-4833.
- Naldini, L., Vigna, E., Ferracini, R., Longati, P., Gandino, L., Prat, M. and Comoglio, P.M. (1991a) The tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene is activated by autophosphorylation. *Mol Cell Biol*, **11**, 1793-1803.
- Naldini, L., Vigna, E., Narsimhan, R.P., Gaudino, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K. and Comoglio, P.M. (1991b) Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene*, **6**, 501-504.
- Naldini, L., Weidner, K.M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzetto, C., Narsimhan, R.P., Hartmann, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K. and et al. (1991c) Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *Embo J*, **10**, 2867-2878.
- Nath, D., Williamson, N.J., Jarvis, R. and Murphy, G. (2001) Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase. *J Cell Sci*, **114**, 1213-1220.
- Nguyen, L., Holgado-Madruga, M., Maroun, C., Fixman, E.D., Kamikura, D., Fournier, T., Charest, A., Tremblay, M.L., Wong, A.J. and Park, M. (1997) Association of the multisubstrate docking protein Gab1 with the hepatocyte growth factor receptor requires a functional Grb2 binding site involving tyrosine 1356. *J Biol Chem*, **272**, 20811-20819.
- Nicholson, D.W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, **6**, 1028-1042.

- Nioche, P., Liu, W.Q., Broutin, I., Charbonnier, F., Latreille, M.T., Vidal, M., Roques, B., Garbay, C. and Ducruix, A. (2002) Crystal structures of the SH2 domain of Grb2: highlight on the binding of a new high-affinity inhibitor. *J Mol Biol*, **315**, 1167-1177.
- Oh, R.R., Park, J.Y., Lee, J.H., Shin, M.S., Kim, H.S., Lee, S.K., Kim, Y.S., Lee, S.H., Lee, S.N., Yang, Y.M., Yoo, N.J., Lee, J.Y. and Park, W.S. (2002) Expression of HGF/SF and Met protein is associated with genetic alterations of VHL gene in primary renal cell carcinomas. *Apmis*, **110**, 229-238.
- Okano, Y., Mizuno, K., Osada, S., Nakamura, T. and Nozawa, Y. (1993) Tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma in c-met/HGF receptor-stimulated hepatocytes: comparison with HepG2 hepatocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **190**, 842-848.
- Okigaki, M., Komada, M., Uehara, Y., Miyazawa, K. and Kitamura, N. (1992) Functional characterization of human hepatocyte growth factor mutants obtained by deletion of structural domains. *Biochemistry*, **31**, 9555-9561.
- Olivero, M., Valente, G., Bardelli, A., Longati, P., Ferrero, N., Cracco, C., Terrone, C., Rocca-Rossetti, S., Comoglio, P.M. and Di Renzo, M.F. (1999) Novel mutation in the ATP-binding site of the MET oncogene tyrosine kinase in a HPRCC family. *Int J Cancer*, **82**, 640-643.
- Ong, S.H., Dilworth, S., Hauck-Schmalenberger, I., Pawson, T. and Kiefer, F. (2001) ShcA and Grb2 mediate polyoma middle T antigen-induced endothelial transformation and Gab1 tyrosine phosphorylation. *Embo J*, **20**, 6327-6336.
- Orian-Rousseau, V. (2003) [CD44 involvement as a regulator of cell proliferation]. *Med Sci (Paris)*, **19**, 405-407.
- Orian-Rousseau, V., Chen, L., Sleeman, J.P., Herrlich, P. and Ponta, H. (2002) CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev*, **16**, 3074-3086.
- Osawa, M., Itoh, S., Ohta, S., Huang, Q., Berk, B.C., Marmarosh, N.L., Che, W., Ding, B., Yan, C. and Abe, J. (2004) ERK1/2 associates with the c-Met-binding domain of growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2)-associated binder-1 (Gab1): role in ERK1/2 and early growth response factor-1 (Egr-1) nuclear accumulation. *J Biol Chem*, **279**, 29691-29699.
- Ostman, A., Hellberg, C. and Bohmer, F.D. (2006) Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**, 307-320.

- Palka, H.L., Park, M. and Tonks, N.K. (2003) Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *J Biol Chem*, **278**, 5728-5735.
- Park, M., Dean, M., Cooper, C.S., Schmidt, M., O'Brien, S.J., Blair, D.G. and Vande Woude, G.F. (1986) Mechanism of met oncogene activation. *Cell*, **45**, 895-904.
- Park, M., Dean, M., Kaul, K., Braun, M.J., Gonda, M.A. and Vande Woude, G. (1987) Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 6379-6383.
- Park, W.S., Dong, S.M., Kim, S.Y., Na, E.Y., Shin, M.S., Pi, J.H., Kim, B.J., Bae, J.H., Hong, Y.K., Lee, K.S., Lee, S.H., Yoo, N.J., Jang, J.J., Pack, S., Zhuang, Z., Schmidt, L., Zbar, B. and Lee, J.Y. (1999) Somatic mutations in the kinase domain of the Met/hepatocyte growth factor receptor gene in childhood hepatocellular carcinomas. *Cancer Res*, **59**, 307-310.
- Parsons, J.T. (2003) Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*, **116**, 1409-1416.
- Paumelle, R., Tulasne, D., Kherrouche, Z., Plaza, S., Leroy, C., Reveneau, S., Vandebunder, B. and Fafeur, V. (2002) Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene*, **21**, 2309-2319.
- Paumelle, R., Tulasne, D., Leroy, C., Coll, J., Vandebunder, B. and Fafeur, V. (2000) Sequential activation of ERK and repression of JNK by scatter factor/hepatocyte growth factor in madin-darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell*, **11**, 3751-3763.
- Pece, S. and Gutkind, J.S. (2002) E-cadherin and Hakai: signalling, remodeling or destruction? *Nat Cell Biol*, **4**, E72-74.
- Pelicci, G., Giordano, S., Zhen, Z., Salcini, A.E., Lanfrancone, L., Bardelli, A., Panayotou, G., Waterfield, M.D., Ponzetto, C., Pelicci, P.G. and et al. (1995) The motogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein. *Oncogene*, **10**, 1631-1638.
- Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzone, M., Giordano, S. and Comoglio, P.M. (2003) Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell*, **3**, 347-361.
- Peschard, P., Fournier, T.M., Lamorte, L., Naujokas, M.A., Band, H., Langdon, W.Y. and Park, M. (2001) Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell*, **8**, 995-1004.

- Peschard, P., Ishiyama, N., Lin, T., Lipkowitz, S. and Park, M. (2004) A conserved DpYR motif in the juxtamembrane domain of the Met receptor family forms an atypical c-Cbl/Cbl-b tyrosine kinase binding domain binding site required for suppression of oncogenic activation. *J Biol Chem*, **279**, 29565-29571.
- Petrelli, A., Gilestro, G.F., Lanzardo, S., Comoglio, P.M., Migone, N. and Giordano, S. (2002) The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature*, **416**, 187-190.
- Phaneuf, D., Moscioni, A.D., LeClair, C., Raper, S.E. and Wilson, J.M. (2004) Generation of a mouse expressing a conditional knockout of the hepatocyte growth factor gene: demonstration of impaired liver regeneration. *DNA Cell Biol*, **23**, 592-603.
- Ponzetto, C., Bardelli, A., Maina, F., Longati, P., Panayotou, G., Dhand, R., Waterfield, M.D. and Comoglio, P.M. (1993) A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Mol Cell Biol*, **13**, 4600-4608.
- Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G. and Comoglio, P.M. (1994) A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell*, **77**, 261-271.
- Ponzetto, C., Zhen, Z., Audero, E., Maina, F., Bardelli, A., Basile, M.L., Giordano, S., Narsimhan, R. and Comoglio, P. (1996) Specific uncoupling of GRB2 from the Met receptor. Differential effects on transformation and motility. *J Biol Chem*, **271**, 14119-14123.
- Poole, A.W. and Jones, M.L. (2005) A SHPing tale: perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail. *Cell Signal*, **17**, 1323-1332.
- Prunotto, C., Crepaldi, T., Forni, P.E., Ieraci, A., Kelly, R.G., Tajbakhsh, S., Buckingham, M. and Ponzetto, C. (2004) Analysis of Mlc-lacZ Met mutants highlights the essential function of Met for migratory precursors of hypaxial muscles and reveals a role for Met in the development of hyoid arch-derived facial muscles. *Dev Dyn*, **231**, 582-591.
- Rahimi, N., Hung, W., Tremblay, E., Saulnier, R. and Elliott, B. (1998) c-Src kinase activity is required for hepatocyte growth factor-induced motility and anchorage-independent growth of mammary carcinoma cells. *J Biol Chem*, **273**, 33714-33721.
- Rahuel, J., Gay, B., Erdmann, D., Strauss, A., Garcia-Echeverria, C., Furet, P., Caravatti, G., Fretz, H., Schoepfer, J. and Grutter, M.G. (1996) Structural basis for specificity of Grb2-SH2 revealed by a novel ligand binding mode. *Nat Struct Biol*, **3**, 586-589.

- Rameh, L.E., Arvidsson, A., Carraway, K.L., 3rd, Couvillon, A.D., Rathbun, G., Crompton, A., VanRenterghem, B., Czech, M.P., Ravichandran, K.S., Burakoff, S.J., Wang, D.S., Chen, C.S. and Cantley, L.C. (1997) A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains. *J Biol Chem*, **272**, 22059-22066.
- Rasola, A., Fassetta, M., De Bacco, F., D'Alessandro, L., Gramaglia, D., Di Renzo, M.F. and Comoglio, P.M. (2006) A positive feedback loop between hepatocyte growth factor receptor and beta-catenin sustains colorectal cancer cell invasive growth. *Oncogene*.
- Ravichandran, K.S. (2001) Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene*, **20**, 6322-6330.
- Reveneau, S., Paumelle, R., Deheuninck, J., Leroy, C., De Launoit, Y. and Fafeur, V. (2003) Inhibition of JNK by HGF/SF prevents apoptosis induced by TNF-alpha. *Ann N Y Acad Sci*, **1010**, 100-103.
- Ricci, J.E., Munoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-Maitre, B., Perkins, G.A., Yadava, N., Scheffler, I.E., Ellisman, M.H. and Green, D.R. (2004) Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell*, **117**, 773-786.
- Robinson, D.R., Wu, Y.M. and Lin, S.F. (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, **19**, 5548-5557.
- Rodrigues, G.A., Falasca, M., Zhang, Z., Ong, S.H. and Schlessinger, J. (2000) A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol*, **20**, 1448-1459.
- Rohrschneider, L.R., Fuller, J.F., Wolf, I., Liu, Y. and Lucas, D.M. (2000) Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev*, **14**, 505-520.
- Rong, S., Segal, S., Anver, M., Resau, J.H. and Vande Woude, G.F. (1994) Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4731-4735.
- Roshan, B., Kjelsberg, C., Spokes, K., Eldred, A., Crovello, C.S. and Cantley, L.G. (1999) Activated ERK2 interacts with and phosphorylates the docking protein GAB1. *J Biol Chem*, **274**, 36362-36368.
- Roskoski, R., Jr. (2005) Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, **331**, 1-14.
- Sachs, M., Brohmann, H., Zechner, D., Muller, T., Hulsken, J., Walther, I., Schaeper, U., Birchmeier, C. and Birchmeier, W. (2000) Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo. *J Cell Biol*, **150**, 1375-1384.

- Sachs, M., Weidner, K.M., Brinkmann, V., Walther, I., Obermeier, A., Ullrich, A. and Birchmeier, W. (1996) Motogenic and morphogenic activity of epithelial receptor tyrosine kinases. *J Cell Biol*, **133**, 1095-1107.
- Sakata, H., Stahl, S.J., Taylor, W.G., Rosenberg, J.M., Sakaguchi, K., Wingfield, P.T. and Rubin, J.S. (1997) Heparin binding and oligomerization of hepatocyte growth factor/scatter factor isoforms. Heparan sulfate glycosaminoglycan requirement for Met binding and signaling. *J Biol Chem*, **272**, 9457-9463.
- Sakkab, D., Lewitzky, M., Posern, G., Schaeper, U., Sachs, M., Birchmeier, W. and Feller, S.M. (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. *J Biol Chem*, **275**, 10772-10778.
- Salvesen, G.S. and Duckett, C.S. (2002) IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 401-410.
- Sattler, M., Pride, Y.B., Ma, P., Gramlich, J.L., Chu, S.C., Quinnan, L.A., Shirazian, S., Liang, C., Podar, K., Christensen, J.G. and Salgia, R. (2003) A novel small molecule met inhibitor induces apoptosis in cells transformed by the oncogenic TPR-MET tyrosine kinase. *Cancer Res*, **63**, 5462-5469.
- Saucier, C., Khoury, H., Lai, K.M., Peschard, P., Dankort, D., Naujokas, M.A., Holash, J., Yancopoulos, G.D., Muller, W.J., Pawson, T. and Park, M. (2004) The Shc adaptor protein is critical for VEGF induction by Met/HGF and ErbB2 receptors and for early onset of tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2345-2350.
- Saucier, C., Papavasiliou, V., Palazzo, A., Naujokas, M.A., Kremer, R. and Park, M. (2002) Use of signal specific receptor tyrosine kinase oncoproteins reveals that pathways downstream from Grb2 or Shc are sufficient for cell transformation and metastasis. *Oncogene*, **21**, 1800-1811.
- Schaaf, C.P., Benzing, J., Schmitt, T., Erz, D.H., Tewes, M., Bartram, C.R. and Janssen, J.W. (2005) Novel interaction partners of the TPR/MET tyrosine kinase. *Faseb J*, **19**, 267-269.
- Schaeper, U., Gehring, N.H., Fuchs, K.P., Sachs, M., Kempkes, B. and Birchmeier, W. (2000) Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J Cell Biol*, **149**, 1419-1432.
- Schiering, N., Casale, E., Caccia, P., Giordano, P. and Battistini, C. (2000) Dimer formation through domain swapping in the crystal structure of the Grb2-SH2-Ac-pYVNV complex. *Biochemistry*, **39**, 13376-13382.

- Schiering, N., Knapp, S., Marconi, M., Flocco, M.M., Cui, J., Perego, R., Rusconi, L. and Cristiani, C. (2003) Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the hepatocyte growth factor receptor c-Met and its complex with the microbial alkaloid K-252a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12654-12659.
- Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T. and van der Geer, P. (1994) Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, **372**, 786-791.
- Schlessinger, J., Lax, I. and Lemmon, M. (1995) Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell*, **83**, 357-360.
- Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E. and Birchmeier, C. (1995) Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*, **373**, 699-702.
- Schmidt, L., Duh, F.M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S.W., Zhuang, Z., Lubensky, I., Dean, M., Allikmets, R., Chidambaram, A., Bergerheim, U.R., Feltis, J.T., Casadevall, C., Zamarron, A., Bernues, M., Richard, S., Lips, C.J., Walther, M.M., Tsui, L.C., Geil, L., Orcutt, M.L., Stackhouse, T., Lipan, J., Slife, L., Brauch, H., Decker, J., Niehans, G., Hughson, M.D., Moch, H., Storkel, S., Lerman, M.I., Linehan, W.M. and Zbar, B. (1997) Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet*, **16**, 68-73.
- Schmidt, L., Junker, K., Nakaigawa, N., Kinjerski, T., Weirich, G., Miller, M., Lubensky, I., Neumann, H.P., Brauch, H., Decker, J., Vocke, C., Brown, J.A., Jenkins, R., Richard, S., Bergerheim, U., Gerrard, B., Dean, M., Linehan, W.M. and Zbar, B. (1999) Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene*, **18**, 2343-2350.
- Schmidt, L., Junker, K., Weirich, G., Glenn, G., Choyke, P., Lubensky, I., Zhuang, Z., Jeffers, M., Vande Woude, G., Neumann, H., Walther, M., Linehan, W.M. and Zbar, B. (1998) Two North American families with hereditary papillary renal carcinoma and identical novel mutations in the MET proto-oncogene. *Cancer Res*, **58**, 1719-1722.
- Schmidt, M.H. and Dikic, I. (2005) The Cbl interactome and its functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 907-919.
- Schmitz, I., Kirchhoff, S. and Krammer, P.H. (2000) Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol*, **32**, 1123-1136.

- Schwall, R.H., Chang, L.Y., Godowski, P.J., Kahn, D.W., Hillan, K.J., Bauer, K.D. and Zioncheck, T.F. (1996) Heparin induces dimerization and confers proliferative activity onto the hepatocyte growth factor antagonists NK1 and NK2. *J Cell Biol*, **133**, 709-718.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M. and Ireton, K. (2000) InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell*, **103**, 501-510.
- Shen, Y., Xie, Q., Norberg, M., Sausville, E., Woude, G.V. and Wenkert, D. (2005) Geldanamycin derivative inhibition of HGF/SF-mediated Met tyrosine kinase receptor-dependent urokinase-plasminogen activation. *Bioorg Med Chem*, **13**, 4960-4971.
- Shimomura, T., Kondo, J., Ochiai, M., Naka, D., Miyazawa, K., Morimoto, Y. and Kitamura, N. (1993) Activation of the zymogen of hepatocyte growth factor activator by thrombin. *J Biol Chem*, **268**, 22927-22932.
- Shinomiya, N., Gao, C.F., Xie, Q., Gustafson, M., Waters, D.J., Zhang, Y.W. and Vande Woude, G.F. (2004) RNA interference reveals that ligand-independent met activity is required for tumor cell signaling and survival. *Cancer Res*, **64**, 7962-7970.
- Smolen, G.A., Sordella, R., Muir, B., Mohapatra, G., Barmettler, A., Archibald, H., Kim, W.J., Okimoto, R.A., Bell, D.W., Sgroi, D.C., Christensen, J.G., Settleman, J. and Haber, D.A. (2006) Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2316-2321.
- Smyth, L.A. and Brady, H.J. (2005) cMet and Fas receptor interaction inhibits death-inducing signaling complex formation in endothelial cells. *Hypertension*, **46**, 100-106.
- Soman, N.R., Correa, P., Ruiz, B.A. and Wogan, G.N. (1991) The TPR-MET oncogenic rearrangement is present and expressed in human gastric carcinoma and precursor lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 4892-4896.
- Son, G., Hirano, T., Seki, E., Iimuro, Y., Nukiwa, T., Matsumoto, K., Nakamura, T. and Fujimoto, J. (2006) Blockage of HGF/c-Met system by gene therapy (adenovirus-mediated NK4 gene) suppresses hepatocellular carcinoma in mice. *J Hepatol*.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X.R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., Yi, T. and et al. (1994) Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol Cell Biol*, **14**, 2777-2785.

- Soriano, J.V., Pepper, M.S., Orci, L. and Montesano, R. (1998) Roles of hepatocyte growth factor/scatter factor and transforming growth factor-beta1 in mammary gland ductal morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **3**, 133-150.
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R.K., Racie, T., Rajeev, K.G., Rohl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Koteliansky, V., Limmer, S., Manoharan, M. and Vornlocher, H.P. (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, **432**, 173-178.
- Stabile, L.P., Lyker, J.S., Huang, L. and Siegfried, J.M. (2004) Inhibition of human non-small cell lung tumors by a c-Met antisense/U6 expression plasmid strategy. *Gene Ther*, **11**, 325-335.
- Stamos, J., Lazarus, R.A., Yao, X., Kirchhofer, D. and Wiesmann, C. (2004) Crystal structure of the HGF beta-chain in complex with the Sema domain of the Met receptor. *Embo J*, **23**, 2325-2335.
- Stefan, M., Koch, A., Mancini, A., Mohr, A., Weidner, K.M., Niemann, H. and Tamura, T. (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. *J Biol Chem*, **276**, 3017-3023.
- Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M. and Vogt, P.K. (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, **260**, 170-173.
- Stoker, M. (1989) Effect of scatter factor on motility of epithelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol*, **139**, 565-569.
- Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M. and Gray, J. (1987) Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature*, **327**, 239-242.
- Stoker, M. and Perryman, M. (1985) An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J Cell Sci*, **77**, 209-223.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. and Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441-446.

- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K. and Takahashi, R. (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*, **8**, 613-621.
- Tajima, H., Matsumoto, K. and Nakamura, T. (1991) Hepatocyte growth factor has potent anti-proliferative activity in various tumor cell lines. *FEBS Lett*, **291**, 229-232.
- Takahashi, T. and Strittmatter, S.M. (2001) Plexina1 autoinhibition by the plexin sema domain. *Neuron*, **29**, 429-439.
- Takahashi, T., Takahashi, K., Mernaugh, R.L., Tsuboi, N., Liu, H. and Daniel, T.O. (2006) A monoclonal antibody against CD148, a receptor-like tyrosine phosphatase, inhibits endothelial cell growth and angiogenesis. *Blood*.
- Takayama, H., LaRochelle, W.J., Sharp, R., Otsuka, T., Kriebel, P., Anver, M., Aaronson, S.A. and Merlino, G. (1997) Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 701-706.
- Take, M., Tsutsui, J., Obama, H., Ozawa, M., Nakayama, T., Maruyama, I., Arima, T. and Muramatsu, T. (1994) Identification of nucleolin as a binding protein for midkine (MK) and heparin-binding growth associated molecule (HB-GAM). *J Biochem (Tokyo)*, **116**, 1063-1068.
- Tamura, M., Arakaki, N., Tsubouchi, H., Takada, H. and Daikuhara, Y. (1993) Enhancement of human hepatocyte growth factor production by interleukin-1 alpha and -1 beta and tumor necrosis factor-alpha by fibroblasts in culture. *J Biol Chem*, **268**, 8140-8145.
- Tanyi, J., Tory, K., Rigo, J., Jr., Nagy, B. and Papp, Z. (1999) Evaluation of the tyrosine kinase domain of the Met proto-oncogene in sporadic ovarian carcinomas*. *Pathol Oncol Res*, **5**, 187-191.
- Tartaglia, M., Mehler, E.L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H.G., Kremer, H., van der Burgt, I., Crosby, A.H., Ion, A., Jeffery, S., Kalidas, K., Patton, M.A., Kucherlapati, R.S. and Gelb, B.D. (2001) Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet*, **29**, 465-468.
- Tate, A., Isotani, S., Bradley, M.J., Sikes, R.A., Davis, R., Chung, L.W. and Edlund, M. (2006) Met-Independent Hepatocyte Growth Factor-mediated regulation of cell adhesion in human prostate cancer cells. *BMC Cancer*, **6**, 197.
- Tawfic, S., Goueli, S.A., Olson, M.O. and Ahmed, K. (1994) Androgenic regulation of phosphorylation and stability of nucleolar protein nucleolin in rat ventral prostate. *Prostate*, **24**, 101-106.

- Tengs, T., Lee, J.C., Guillermo Paez, J., Zhao, X., Laframboise, T., Giannoukos, G. and Thomas, R.K. (2006) A transforming MET mutation discovered in non-small cell lung cancer using microarray-based resequencing. *Cancer Lett*, **239**, 227-233.
- Terasawa, H., Kohda, D., Hatanaka, H., Tsuchiya, S., Ogura, K., Nagata, K., Ishii, S., Mandiyan, V., Ullrich, A., Schlessinger, J. and et al. (1994) Structure of the N-terminal SH3 domain of GRB2 complexed with a peptide from the guanine nucleotide releasing factor Sos. *Nat Struct Biol*, **1**, 891-897.
- Thien, C.B. and Langdon, W.Y. (2001) Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 294-307.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*, **281**, 1312-1316.
- Tjin, E.P., Groen, R.W., Vogelzang, I., Derksen, P.W., Klok, M.D., Meijer, H.P., van Eeden, S., Pals, S.T. and Spaargaren, M. (2006) Functional analysis of HGF/MET signaling and aberrant HGF-activator expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, **107**, 760-768.
- Togashi, H., Schmidt, E.F. and Strittmatter, S.M. (2006) RanBPM contributes to Semaphorin3A signaling through plexin-A receptors. *J Neurosci*, **26**, 4961-4969.
- Trusolino, L., Bertotti, A. and Comoglio, P.M. (2001) A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell*, **107**, 643-654.
- Trusolino, L. and Comoglio, P.M. (2002) Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer*, **2**, 289-300.
- Tsugawa, K., Yonemura, Y., Hirono, Y., Fushida, S., Kaji, M., Miwa, K., Miyazaki, I. and Yamamoto, H. (1998) Amplification of the c-met, c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor gene in human gastric cancers: correlation to clinical features. *Oncology*, **55**, 475-481.
- Tsukada, Y., Miyazawa, K. and Kitamura, N. (2001) High intensity ERK signal mediates hepatocyte growth factor-induced proliferation inhibition of the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *J Biol Chem*, **276**, 40968-40976.
- Tsukada, Y., Tanaka, T., Miyazawa, K. and Kitamura, N. (2004) Involvement of down-regulation of Cdk2 activity in hepatocyte growth factor-induced cell cycle arrest at G1 in the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *J Biochem (Tokyo)*, **136**, 701-709.

- Tsygankov, A.Y., Teckchandani, A.M., Feshchenko, E.A. and Swaminathan, G. (2001) Beyond the RING: CBL proteins as multivalent adapters. *Oncogene*, **20**, 6382-6402.
- Tulasne, D., Paumelle, R., Leroy, C., Reveneau, S., Vandebunder, B. and Fafeur, V. (2002) Involvement of RAS-ERK signaling in multiple biological responses to HGF/SF. *Ann N Y Acad Sci*, **973**, 105-108.
- Tulasne, D., Paumelle, R., Weidner, K.M., Vandebunder, B. and Fafeur, V. (1999) The multisubstrate docking site of the MET receptor is dispensable for MET-mediated RAS signaling and cell scattering. *Mol Biol Cell*, **10**, 551-565.
- Turner, H., Reif, K., Rivera, J. and Cantrell, D.A. (1995) Regulation of the adapter molecule Grb2 by the Fc epsilon R1 in the mast cell line RBL2H3. *J Biol Chem*, **270**, 9500-9506.
- Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shiota, K., Kuno, J., Noda, T. and Kitamura, N. (1995) Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature*, **373**, 702-705.
- Urbe, S., Mills, I.G., Stenmark, H., Kitamura, N. and Clague, M.J. (2000) Endosomal localization and receptor dynamics determine tyrosine phosphorylation of hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate. *Mol Cell Biol*, **20**, 7685-7692.
- Urbe, S., Sachse, M., Row, P.E., Preisinger, C., Barr, F.A., Strous, G., Klumperman, J. and Clague, M.J. (2003) The UIM domain of Hrs couples receptor sorting to vesicle formation. *J Cell Sci*, **116**, 4169-4179.
- van der Voort, R., Taher, T.E., Wielenga, V.J., Spaargaren, M., Prevo, R., Smit, L., David, G., Hartmann, G., Gherardi, E. and Pals, S.T. (1999) Heparan sulfate-modified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor-induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met. *J Biol Chem*, **274**, 6499-6506.
- Van Vactor, D.V. and Lorenz, L.J. (1999) Neural development: The semantics of axon guidance. *Curr Biol*, **9**, R201-204.
- Vanhaesebroeck, B., Ali, K., Bilancio, A., Geering, B. and Foukas, L.C. (2005) Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci*, **30**, 194-204.
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J. and Kreft, J. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*, **14**, 584-640.
- Veiga, E. and Cossart, P. (2005) *Listeria* hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat Cell Biol*, **7**, 894-900.

- Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P.G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., Moritz, R.L., Simpson, R.J. and Vaux, D.L. (2002) HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem*, **277**, 445-454.
- Vigna, E., Gramaglia, D., Longati, P., Bardelli, A. and Comoglio, P.M. (1999) Loss of the exon encoding the juxtamembrane domain is essential for the oncogenic activation of TPR-MET. *Oncogene*, **18**, 4275-4281.
- Vihinen, M. and Smith, C.I. (1996) Structural aspects of signal transduction in B-cells. *Crit Rev Immunol*, **16**, 251-275.
- Villa-Moruzzi, E., Lapi, S., Prat, M., Gaudino, G. and Comoglio, P.M. (1993) A protein tyrosine phosphatase activity associated with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *J Biol Chem*, **268**, 18176-18180.
- Villa-Moruzzi, E., Puntoni, F., Bardelli, A., Vigna, E., De Rosa, S. and Comoglio, P.M. (1998) Protein tyrosine phosphatase PTP-S binds to the juxtamembrane region of the hepatocyte growth factor receptor Met. *Biochem J*, **336 (Pt 1)**, 235-239.
- Wahl, R.C., Hsu, R.Y., Huff, J.L., Jelinek, M.A., Chen, K., Courchesne, P., Patterson, S.D., Parsons, J.T. and Welcher, A.A. (1999) Chicken macrophage stimulating protein is a ligand of the receptor protein-tyrosine kinase Sea. *J Biol Chem*, **274**, 26361-26368.
- Wajih, N., Walter, J. and Sane, D.C. (2002) Vascular origin of a soluble truncated form of the hepatocyte growth factor receptor (c-met). *Circ Res*, **90**, 46-52.
- Wallenius, V., Hisaoka, M., Helou, K., Levan, G., Mandahl, N., Meis-Kindblom, J.M., Kindblom, L.G. and Jansson, J.O. (2000) Overexpression of the hepatocyte growth factor (HGF) receptor (Met) and presence of a truncated and activated intracellular HGF receptor fragment in locally aggressive/malignant human musculoskeletal tumors. *Am J Pathol*, **156**, 821-829.
- Waltz, S.E., Eaton, L., Toney-Earley, K., Hess, K.A., Peace, B.E., Ihlendorf, J.R., Wang, M.H., Kaestner, K.H. and Degen, S.J. (2001) Ron-mediated cytoplasmic signaling is dispensable for viability but is required to limit inflammatory responses. *J Clin Invest*, **108**, 567-576.
- Wang, D., Li, Z., Messing, E.M. and Wu, G. (2002a) Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. *J Biol Chem*, **277**, 36216-36222.
- Wang, D., Li, Z., Schoen, S.R., Messing, E.M. and Wu, G. (2004) A novel MET-interacting protein shares high sequence similarity with RanBPM, but fails to stimulate MET-induced Ras/Erk signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, **313**, 320-326.

- Wang, M.H., Ronsin, C., Gesnel, M.C., Coupey, L., Skeel, A., Leonard, E.J. and Breathnach, R. (1994) Identification of the ron gene product as the receptor for the human macrophage stimulating protein. *Science*, **266**, 117-119.
- Wang, R., Ferrell, L.D., Faouzi, S., Maher, J.J. and Bishop, J.M. (2001) Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J Cell Biol*, **153**, 1023-1034.
- Wang, R., Kobayashi, R. and Bishop, J.M. (1996) Cellular adherence elicits ligand-independent activation of the Met cell-surface receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8425-8430.
- Wang, W., Marimuthu, A., Tsai, J., Kumar, A., Krupka, H.I., Zhang, C., Powell, B., Suzuki, Y., Nguyen, H., Tabrizizad, M., Luu, C. and West, B.L. (2006) Structural characterization of autoinhibited c-Met kinase produced by coexpression in bacteria with phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 3563-3568.
- Wang, X., DeFrances, M.C., Dai, Y., Pediaditakis, P., Johnson, C., Bell, A., Michalopoulos, G.K. and Zarnegar, R. (2002b) A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol Cell*, **9**, 411-421.
- Wang, Z. and Moran, M.F. (2002) Phospholipase C-gamma1: a phospholipase and guanine nucleotide exchange factor. *Mol Interv*, **2**, 352-355,338.
- Wasenius, V.M., Hemmer, S., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Nupponen, N.N., Franssila, K. and Joensuu, H. (2005) MET receptor tyrosine kinase sequence alterations in differentiated thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol*, **29**, 544-549.
- Watanabe, K., Chirgadze, D.Y., Lietha, D., de Jonge, H., Blundell, T.L. and Gherardi, E. (2002) A new crystal form of the NK1 splice variant of HGF/SF demonstrates extensive hinge movement and suggests that the NK1 dimer originates by domain swapping. *J Mol Biol*, **319**, 283-288.
- Watanabe, T., Tsuda, M., Makino, Y., Ichihara, S., Sawa, H., Minami, A., Mochizuki, N., Nagashima, K. and Tanaka, S. (2006) Adaptor molecule crk is required for sustained phosphorylation of grb2-associated binder 1 and hepatocyte growth factor-induced cell motility of human synovial sarcoma cell lines. *Mol Cancer Res*, **4**, 499-510.
- Webb, C.P., Hose, C.D., Koochekpour, S., Jeffers, M., Oskarsson, M., Sausville, E., Monks, A. and Vande Woude, G.F. (2000) The geldanamycins are potent inhibitors of the hepatocyte growth factor/scatter factor-met-urokinase plasminogen activator-plasmin proteolytic network. *Cancer Res*, **60**, 342-349.

- Weidner, K.M., Arakaki, N., Hartmann, G., Vandekerckhove, J., Weingart, S., Rieder, H., Fonatsch, C., Tsubouchi, H., Hishida, T., Daikuhara, Y. and et al. (1991) Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7001-7005.
- Weidner, K.M., Di Cesare, S., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J. and Birchmeier, W. (1996) Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature*, **384**, 173-176.
- Weidner, K.M., Sachs, M. and Birchmeier, W. (1993) The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J Cell Biol*, **121**, 145-154.
- Weidner, K.M., Sachs, M., Riethmacher, D. and Birchmeier, W. (1995) Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2597-2601.
- Willert, K. and Jones, K.A. (2006) Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev*, **20**, 1394-1404.
- Winberg, M.L., Noordermeer, J.N., Tamagnone, L., Comoglio, P.M., Spriggs, M.K., Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C.S. (1998) Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell*, **95**, 903-916.
- Wu, C.J., O'Rourke, D.M., Feng, G.S., Johnson, G.R., Wang, Q. and Greene, M.I. (2001) The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for mediating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by growth factors. *Oncogene*, **20**, 6018-6025.
- Wullich, B., Sattler, H.P., Fischer, U. and Meese, E. (1994) Two independent amplification events on chromosome 7 in glioma: amplification of the epidermal growth factor receptor gene and amplification of the oncogene MET. *Anticancer Res*, **14**, 577-579.
- Xie, Q., Gao, C.F., Shinomiya, N., Sausville, E., Hay, R., Gustafson, M., Shen, Y., Wenkert, D. and Vande Woude, G.F. (2005) Geldanamycins exquisitely inhibit HGF/SF-mediated tumor cell invasion. *Oncogene*, **24**, 3697-3707.
- Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M.J. and Harrison, S.C. (1999) Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell*, **3**, 629-638.
- Yanagita, K., Matsumoto, K., Sekiguchi, K., Ishibashi, H., Niho, Y. and Nakamura, T. (1993) Hepatocyte growth factor may act as a pulmotrophic factor on lung regeneration after acute lung injury. *J Biol Chem*, **268**, 21212-21217.
- Yang, Y., Spitzer, E., Meyer, D., Sachs, M., Niemann, C., Hartmann, G., Weidner, K.M., Birchmeier, C. and Birchmeier, W. (1995) Sequential requirement of hepatocyte

- growth factor and neuregulin in the morphogenesis and differentiation of the mammary gland. *J Cell Biol*, **131**, 215-226.
- Ye, L., Peng, L., Tan, H. and Zhou, X. (2006) HGF Enhanced Proliferation and Differentiation of Dental Pulp Cells. *J Endod*, **32**, 736-741.
- Yu, J., Miehke, S., Ebert, M.P., Hoffmann, J., Breidert, M., Alpen, B., Starzynska, T., Stolte Prof, M., Malfertheiner, P. and Bayerdorffer, E. (2000) Frequency of TPR-MET rearrangement in patients with gastric carcinoma and in first-degree relatives. *Cancer*, **88**, 1801-1806.
- Yuan, Z.L., Guan, Y.J., Wang, L., Wei, W., Kane, A.B. and Chin, Y.E. (2004) Central role of the threonine residue within the p+1 loop of receptor tyrosine kinase in STAT3 constitutive phosphorylation in metastatic cancer cells. *Mol Cell Biol*, **24**, 9390-9400.
- Yuzawa, S., Yokochi, M., Hatanaka, H., Ogura, K., Kataoka, M., Miura, K., Mandiyan, V., Schlessinger, J. and Inagaki, F. (2001) Solution structure of Grb2 reveals extensive flexibility necessary for target recognition. *J Mol Biol*, **306**, 527-537.
- Zeng, G., Apte, U., Micsenyi, A., Bell, A. and Monga, S.P. (2006) Tyrosine residues 654 and 670 in beta-catenin are crucial in regulation of Met-beta-catenin interactions. *Exp Cell Res*.
- Zhang, S.Q., Yang, W., Kontaridis, M.I., Bivona, T.G., Wen, G., Araki, T., Luo, J., Thompson, J.A., Schraven, B.L., Philips, M.R. and Neel, B.G. (2004) Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol Cell*, **13**, 341-355.
- Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P.A. and Kuriyan, J. (2006) An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, **125**, 1137-1149.
- Zhang, Y.W., Wang, L.M., Jove, R. and Vande Woude, G.F. (2002) Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis. *Oncogene*, **21**, 217-226.
- Zhou, H., Mazzulla, M.J., Kaufman, J.D., Stahl, S.J., Wingfield, P.T., Rubin, J.S., Bottaro, D.P. and Byrd, R.A. (1998) The solution structure of the N-terminal domain of hepatocyte growth factor reveals a potential heparin-binding site. *Structure*, **6**, 109-116.
- Zhou, M.M., Ravichandran, K.S., Olejniczak, E.F., Petros, A.M., Meadows, R.P., Sattler, M., Harlan, J.E., Wade, W.S., Burakoff, S.J. and Fesik, S.W. (1995) Structure and ligand recognition of the phosphotyrosine binding domain of Shc. *Nature*, **378**, 584-592.

- Zhou, Y.Q., He, C., Chen, Y.Q., Wang, D. and Wang, M.H. (2003) Altered expression of the RON receptor tyrosine kinase in primary human colorectal adenocarcinomas: generation of different splicing RON variants and their oncogenic potential. *Oncogene*, **22**, 186-197.
- Zimmermann, K.C. and Green, D.R. (2001) How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol*, **108**, S99-103.
- Zioncheck, T.F., Richardson, L., Liu, J., Chang, L., King, K.L., Bennett, G.L., Fugedi, P., Chamow, S.M., Schwall, R.H. and Stack, R.J. (1995) Sulfated oligosaccharides promote hepatocyte growth factor association and govern its mitogenic activity. *J Biol Chem*, **270**, 16871-16878.
- Zou, Y., Lim, S., Lee, K., Deng, X. and Friedman, E. (2003) Serine/threonine kinase Mirk/Dyrk1B is an inhibitor of epithelial cell migration and is negatively regulated by the Met adaptor Ran-binding protein M. *J Biol Chem*, **278**, 49573-49581.

Résumé

L'*hepatocyte growth factor/scatter factor* (HGF/SF) est le ligand du récepteur tyrosine kinase MET, qui favorise les capacités de survie, prolifération, motilité et morphogénèse des cellules épithéliales. La signalisation de l'HGF/SF-MET est essentielle au cours du développement et sa dérégulation peut conduire au développement tumoral et à la progression métastatique. La surexpression du récepteur et/ou du ligand est associée à de nombreux cancers et est souvent corrélée à un mauvais pronostic. De plus, un lien causatif entre MET et le cancer est établi depuis l'identification de mutations activatrices de MET dans le cancer papillaire rénal héréditaire.

L'activation du récepteur MET par l'HGF/SF est classiquement associée à la survie cellulaire, en réponse à des stress variés. Cependant, nos travaux nous ont amené à montrer qu'en absence d'HGF/SF, ces mêmes stress peuvent convertir le récepteur MET en facteur pro-apoptotique. En effet, nous avons montré que le récepteur est clivé par les caspases dans sa région juxtamembranaire, permettant la génération de deux fragments fonctionnels : un fragment transmembranaire, p100 MET, correspondant à un récepteur-leurre, et un fragment p40 MET, cytosolique, possédant des capacités pro-apoptotiques. Nous avons également montré que le clivage juxtamembranaire est régulé négativement par l'activation du récepteur, par la phosphorylation d'un résidu tyrosine juxtaposé au site de clivage par les caspases.

Ces travaux révèlent que MET est une cible fonctionnelle des caspases et mettent en évidence que l'HGF/SF et MET participent à la balance survie/apoptose.