

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

**THESE de DOCTORAT**  
Biologie-Santé

Présentée par  
Bénédicte FOVEAU

**Régulation des fonctions du récepteur tyrosine  
kinase MET par clivages protéolytiques.**

Soutenance le 16 Novembre 2007  
Devant le jury composé de :

Président :	Pr Hubert HONDERMARCK	Université de Lille 1
Rapporteurs :	Dr Fabienne LAMBALLE	Université de Marseille
	Dr Patrick MAYEUX	Université de Paris
Examineur :	Dr Bernadette ALLINQUANT	Université de Paris
Directeur de Thèse :	Dr David TULASNE	Université de Lille 1
Directeur de Laboratoire :	Pr Yvan de LAUNOIT	Université de Lille 1

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury qui ont accepté de juger mon travail. Merci aux Dr Fabienne Lamballe et Patrick Mayeux d'avoir accepté d'être mes rapporteurs, au Pr Hubert Hondermarck de présider ce jury et au Dr Bernadette Allinquant d'être mon examinateur.

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

Je remercie de tout cœur chaque membre de l'équipe « MET » : Véronique Fafeur , grâce à qui tout a commencé et qui m'a toujours encouragée dans cette voie qu'est la recherche ; Catherine Leroy à double titre : sur le plan scientifique, de m'avoir formée de manière aussi rigoureuse et consciencieuse depuis le tout début et sur le plan humain, petit bonbon acidulé, pour ton immense gentillesse, ta disponibilité et pour tous les moments que l'on a partagés ; Frédéric Ancot, pour tous nos échanges et discussions (scientifiques, ou non d'ailleurs), tous tes petits coups de main quand j'en ai eu besoin, tes encouragements au quotidien et la bonne humeur que tu as apportée; Julien Deheuninck, pour tes discussions diverses et d'avoir testé chaque étape de la thèse avant moi (et oui, un DEUG ça peut faire des choses !) ; Jonathan Lefebvre, pour ta gentillesse, même si on ne s'est pas côtoyé longtemps; et bien sûr David Tulasne, de m'avoir encadrée aussi efficacement durant ces années, de m'avoir initiée aux joies de l'écriture (pour le pire et le meilleur) mais aussi d'avoir su pimenter ma thèse de touches constantes d'optimisme, de bonne humeur et de petits proverbes fort utiles (La peur n'évite pas le danger !).

Un merci tout particulier à Chantal Vercamer , ma voisine de paillasse : tu as toujours été de bon conseil, et grâce à toi j'ai voyagé beaucoup plus que je ne l'aurais cru. Ces petites bouffées d'air vont me manquer (ton pain d'épice et ton gâteau au chocolat aussi).

Merci aussi à tous mes compagnons de thèse : Cindy (poussin n°1), pour ton énergie, ta franchise, ta générosité, toutes ces petites choses que j'ai pu découvrir depuis le DEUG, toutes nos discussions et nos sorties (tu diras bonjour aux caribous); Sébastien (poussin n°2), pour tous tes délires, de m'avoir initiée à la techno et aux sorties en boîte; Alessandro, tu as apporté au laboratoire comme un peu de douceur dans ce monde de brutes, bien sûr avec toutes les petites sucreries mais aussi par ta gentillesse et ton humour ravageur.

Merci à toutes les personnes de l'UMR8161 de l'IBL dont j'ai pu apprécier la gentillesse et qui ont su créer une bonne ambiance au sein du laboratoire.

Je remercie la Région Nord Pas de Calais et l'Institut Pasteur de Lille de m'avoir financée durant ces trois années de thèse.

Pour finir, mes parents, Nico, Fred et Marie, c'est beaucoup grâce à vous que j'en suis là finalement, et que j'ai pu « affronter » sereinement ces années de DEA et Thèse en gardant un moral d'acier et en sachant relativiser tous mes « petits malheurs » du labo. Frédéric, toi seul connais ce que j'ai vécu durant ma thèse dans les moindres détails, toi seul as su m'épauler et me reconforter dans les moments plus difficiles que les autres, alors juste pour toi, merci, mais tu sais que c'est un merci qui en dit long...

## RESUME

L'*hepatocyte growth factor/scatter factor* (HGF/SF) est le ligand du récepteur tyrosine kinase MET, qui induit des réponses de survie, prolifération, motilité et morphogénèse sur 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.

L'activation du récepteur MET par l'HGF/SF est classiquement associée à la survie cellulaire, en réponse à des stress variés. Cependant, nous avons montré qu'en absence d'HGF/SF, ces mêmes stress peuvent convertir le récepteur MET en facteur pro-apoptotique capable d'amplifier l'apoptose. En effet, MET est clivé de manière séquentielle par les caspases durant l'apoptose, sur son extrémité C-terminale puis dans sa région juxtamembranaire, générant un fragment p40 MET. La fonction apoptotique de p40 MET nécessite son activité kinase mais également sa dimérisation *via* son domaine C-terminal. D'autre part, nous avons montré que le récepteur MET est constitutivement clivé par des métalloprotéases dans son domaine extracellulaire, créant un fragment N-terminal soluble (MET-NTF) et un C-terminal membranaire (MET-CTF). Ce dernier est ensuite protéolysé par le complexe  $\gamma$ -secrétase, conduisant à la libération d'un fragment intracellulaire instable (MET-ICD), qui peut transloquer dans le noyau. De plus, l'inhibition des activités métalloprotéase et  $\gamma$ -secrétase empêche l'expression de c-Jun induite par l'HGF/SF.

Nos résultats démontrent que les clivages protéolytiques du récepteur MET conduisent à la génération de différents fragments actifs qui redéploient le récepteur vers d'autres localisations cellulaires et qui diversifient ses réponses biologiques.

Mots clés: MET, récepteur tyrosine kinase, HGF/SF, caspase, secrétase

Thèse réalisée à : UMR8161 – Institut de Biologie de Lille  
Equipe 5 « Initiation et Evolution des Cancers Epithéliaux »  
1, rue du Professeur Calmette  
59021 LILLE Cedex – France

## ABSTRACT

The *hepatocyte growth factor/ scatter factor* (HGF/SF) acts through the MET tyrosine kinase receptor to promote survival, proliferation, motility and morphogenesis on epithelial cells. Signaling of HGF/SF-MET is crucial during development and its deregulation can lead to tumoral development et metastatic progression.

Activation of MET by HGF/SF is classically associated to survival, in response to stimuli. Nonetheless, we showed that in absence of HGF/SF, these stress can convert MET receptor in pro-apoptotic factor, able to amplify apoptosis. Indeed, MET is cleaved sequentially by caspases during apoptosis, within its C-terminal extremity then within its juxtamembrane region, to generate a fragment p40 MET. The pro-apoptotic fonction of p40 MET requires its kinase activity as well as its dimerization through its C-terminal domain. We next revealed that MET receptor is also constitutively shedded by metalloprotease in its extracellular domain, leading to the generation of a soluble N-terminal fragment (MET-NTF) and another C-terminal membrane-anchored (MET-CTF). This latter is in turn cleaved by  $\gamma$ -secretase, which leads to the generation of an unstable intracellular fragment (MET-ICD), which can translocate to nucleus. Importantly, we showed that inhibition of metalloprotease and  $\gamma$ -secretase activities prevented HGF/SF-induced expression of the immediate early gene c-Jun.

Our results demonstrate that proteolytic cleavages of MET receptor lead to the generation of biologically active fragments whcih redeploy the receptor to other cellular compartments and diversify its biological responses.

Keywords: MET, tyrosine kinase receptor, HGF/SF, caspase, secretase

# SOMMAIRE

RESUME.....	4
ABSTRACT.....	5
SOMMAIRE.....	6
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	8
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
INTRODUCTION.....	12
<i>Première partie : MET et HGF/SF : structure, fonction et signalisation</i> .....	12
I.    MET, récepteur tyrosine kinase au facteur de croissance HGF/SF .....	12
A.    Le récepteur tyrosine kinase MET.....	12
B.    L'Hepatocyte Growth Factor ou Scatter Factor.....	14
C.    L'HGF/SF, un ligand pour MET .....	15
II.    Implication du couple HGF/SF-MET dans la mise en place et l'homéostasie des tissus épithéliaux .....	16
A.    Lors du développement embryonnaire .....	16
B.    Chez l'adulte .....	18
C.    Les effets de l'HGF/SF sur des cellules en culture .....	19
III.   Le réseau de signalisation de l'HGF/SF et MET.....	20
A.    L'HGF/SF active son récepteur MET.....	20
B.    Signalisation de l'HGF/SF et MET : un travail à la chaîne .....	23
C.    Cibles transcriptionnelles du couple HGF/SF-MET .....	28
D.    MET dialogue pour de meilleures réponses .....	29
IV.   Rôle du couple HGF/SF-MET dans le cancer .....	32
A.    Dérégulations du couple HGF/SF-MET .....	32
B.    Thérapies.....	35
<i>Deuxième partie : La protéolyse, un mode d'action</i> .....	39
I.    Clivages par les caspases .....	39
A.    L'apoptose, une mort cellulaire programmée .....	39
B.    Cibles des caspases, protéases clés de l'apoptose .....	42
II.   Elagage de l'ectodomaine par des métalloprotéases .....	47
A.    Une guillotine membranaire .....	47
B.    Métalloprotéases, régulateurs de l'élagage.....	48
C.    Conséquences fonctionnelles de cette décapitation.....	49
III.  La Protéolyse Intramembranaire Régulée dépendant des Présénilines .....	53
A.    Protéolyse intramembranaire régulée .....	53
B.    Protéolyse Intramembranaire Régulée dépendant des Présénilines (PS-RIP) .....	55

RESULTATS ET DISCUSSION.....	65
Première partie : MET, une cible fonctionnelle des caspases.....	65
I. Introduction.....	65
II. Résultats : Amplification de l'apoptose par clivage séquentiel du récepteur tyrosine kinase MET par les caspases.....	66
A. Publication 1 .....	66
B. Résultats complémentaires : p40 MET, un amplificateur plutôt qu'un inducteur d'apoptose.....	67
III. Résultats complémentaires.....	69
A. L'activité kinase est essentielle pour les capacités apoptotiques de p40 MET .....	69
B. La forme constitutivement active TPR-MET n'induit pas l'apoptose .....	70
C. p40 MET n'est pas capable d'activer la voie Ras-MAPK ERK.....	71
D. p40 MET n'a pas de capacité transformante .....	72
E. Le domaine de dimérisation de TPR abolit les capacités apoptotiques de p40 MET .....	72
F. p40 MET se dimérise via son domaine C-terminal .....	74
G. La capacité apoptotique de p40 MET requiert sa région C-terminale .....	76
IV. Conclusion et discussion .....	79
A. Des clivages bien organisés.....	79
B. p40 MET, un fragment apoptotique .....	82
C. MET sur la voie des récepteurs à dépendance .....	84
D. Clivages caspases de MET et cancer .....	85
E. Le récepteur tyrosine kinase MET, un agent double .....	85
Deuxième partie : MET, une cible des sécrétases, ADAM et $\gamma$ -sécrétase .....	86
I. Introduction.....	86
II. Résultats : Régulation de MET par les sécrétases.....	87
A. Publication 3 .....	87
B. Résultats complémentaires.....	88
III. Conclusion et discussion .....	93
A. La PS-RIP de MET harmonise les fragments.....	93
B. La caractérisation des clivages sécrétases .....	94
C. Activation transcriptionnelle : une fonction potentielle pour MET-ICD.....	96
D. Régulateurs fonctionnels ou produits de dégradation, entre les deux MET-ICD balance.....	98
E. Clivages $\gamma$ -sécrétase de MET, une nouvelle ouverture pour le cancer.....	99
DISCUSSION GENERALE.....	101
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	104
ANNEXES.....	121

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Structure et modèle tri-dimensionnel des domaines du récepteur MET. ....	13
Figure 2 : Structure et modèle tri-dimensionnel des domaines de l'HGF/SF. ....	15
Figure 3 : Rôles de l'HGF/SF et MET dans le développement embryonnaire. ....	18
Figure 4 : Réponses biologiques de l'HGF/SF et MET sur des cultures de cellules épithéliales MDCK (Madin-Darby Canine Kidney). ....	20
Figure 5 : Modèle de dimérisation du récepteur tyrosine kinase MET. ....	21
Figure 6 : Les principales tyrosines phosphorylées du récepteur MET. ....	23
Figure 7 : Exemples de voies de signalisation initiées par MET. ....	24
Figure 8 : Régulation de la dégradation de MET par l'HGF/SF. ....	27
Figure 9 : Réseaux d'interactions membranaires de MET. ....	30
Figure 10 : Tableau des cancers impliquant le couple de l'HGF/SF-MET. ....	33
Figure 11 : Stratégies des thérapies visant MET et l'HGF/SF. ....	37
Figure 12 : Déroulement de l'apoptose en plusieurs étapes. ....	40
Figure 13 : Les caspases. ....	41
Figure 14 : Voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque. ....	42
Figure 15 : Modèle du rôle de la translocation de Mst1 dans l'apoptose. ....	44
Figure 16 : Liste des récepteurs à dépendance. ....	45
Figure 17 : Mécanismes de fonctionnement des récepteurs à dépendance. ....	46
Figure 18 : Organisation classique d'une protéine ADAM. ....	48
Figure 19 : Régulation des clivages médiés par les ADAM. ....	49
Figure 20 : Implication de l'élagage dans la signalisation des ligands. ....	50
Figure 21 : Les quatre protéases intramembranaires. ....	54
Figure 22 : Modèle topologique du complexe $\gamma$ -secrétase. ....	56
Figure 23 : Liste des substrats de la préséniline. ....	57
Figure 24 : Métabolisme de APP et génération de peptides. ....	59
Figure 25 : La voie de signalisation canonique de Notch impliquant une PS-RIP. ....	61
Figure 26 : Voies de signalisation canonique et nucléaire de ErbB4. ....	63
Figure 27 : Représentation schématique du désassemblage des CAJ médié par le clivage de la E-cadhérine par la $\gamma$ -secrétase. ....	64
Figure 28 : Amplification de l'apoptose par l'induction de l'expression de p40 MET. ....	68
Figure 29 : Phosphorylation et recrutement de p40 MET. ....	70
Figure 30 : Activation de la voie Ras-MAPK par TPR-MET et p40 MET. ....	71
Figure 31 : Test de transformation. ....	72
Figure 32 : Comparaison de p40 MET, TPR-MET et TPR-p40 MET. ....	73



Figure 33 : Dimérisation de p40 MET. ....	75
Figure 34 : Capacités apoptotiques de différents mutants de p40 MET. ....	77
Figure 35 : Effet transcriptionnel de GAL4 MET-ICD. ....	88
Figure 36 : Tests biologiques.....	90
Figure 37 : Test de transformation.....	91
Figure 38 : Effet de l'HGF/SF et du PMA sur les clivages de MET.....	92
Figure 39 : Schéma récapitulatif des clivages de MET. ....	101

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ADAM** : A Disintegrin And Metalloproteinase protein  
**ADD** : Addiction/Dependence Domain  
**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique  
**ALK** : Anaplastic Lymphoma Kinase  
**AP1** : Activator Protein 1  
**APAF1** : Apoptotic Protease Activating Factor 1  
**APH1** : Anterior Pharynx Defective-1  
**APP** : Amyloid Protein Precursor  
**AR** : Androgen Receptor  
**ARN** : Acide RiboNucléique  
**ATP** : Adenosine TriPhosphate  
**BACE** :  $\beta$ -site APP-Cleaving Enzyme  
**BAD** : Bcl-xL/Bcl-2-Associated Death promoter  
**Bcl-2** : B-Cell Leukemia/lymphoma 2  
**Bcl-xL** : B-Cell Leukaemia/lymphoma-X Long  
**CAJ** : Cadherin-based Adherens Junctions  
**CASPASE** : Cystein ASPartyl-specific proteASE  
**CDC42** : Cell Division Cycle 42  
**ciAP** : cellular Inhibitor of Apoptosis Protein  
**CSL** : CBP/RBPjk in *Mus musculus*, S(H) in *Drosophila*, Lag-1 in *Caenorhabditis elegans*  
**CTF** : C-Terminal Fragment  
**DAXX** : Death-Associated protein 6  
**DIP13 $\alpha$**  : DCC-Interacting Protein 13 $\alpha$   
**DCC** : Deleted in Colorectal Cancer  
**EGF** : Epidermal Growth Factor  
**ETS** : E Twenty-Six  
**ERK** : Extracellular signal-Regulated Kinase  
**FAK** : Focal Adhesion Kinase  
**FAS (CD95 or APO-1)** : Fibroblast ASSociated  
**GAB1** : Grb2 Associated Binding 1  
**GDP** : Guanosine DiPhosphate  
**GFAP** : Glial Fibrillary Acidic Protein  
**GFP** : Green Fluorescent Protein  
**GPCR** : G Protein-Coupled Receptor  
**GRB2** : Growth factor Receptor-Bound protein 2  
**GTP** : Guanosine TriPhosphate  
**HB-EGF** : Heparin-binding EGF-like growth factor  
**HER (erbB)** : Human Epidermal growth factor Receptor  
**HGF/SF** : Hepatocyte Growth Factor / Scatter Factor  
**HDAC** : Histone DesAcetylase  
**HES** : Hairy and Enhancer of Split  
**HRS** : Hepatocyte growth factor Regulated tyrosine kinase Substrate  
**ICD** : IntraCellular Domain  
**IEGs** : Immediate Early Genes  
**IKB** : I Kappa B  
**JNK** : c-Jun N-terminal Kinase  
**KO** : Knock-Out  
**MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinase  
**MEC** : Matrix Extra-Cellular  
**METZINCIN** : ZINC-dependent METalloprotease  
**MDB** : Met Binding Domain

**MST1** : Macrophage Stimulating Protein-1  
**MMP** : Matrix MetalloProteinase  
**NCOR** : Nuclear receptor CORepressor  
**NES** : Nuclear Export Signal  
**NEXT** : Notch EXtracellular membrane Truncation  
**NFκB** : Nuclear Factor-κB  
**NICD** : Notch IntraCellular Domain  
**NK1-4** : Natural Killer cell transcript 1-4  
**NTF** : N-Terminal Fragment  
**PAI-1** : Plasminogen Activator Inhibitor 1  
**PAK** : p21-Activated protein Kinase  
**PEN-2** : Presenilin ENhancer-2  
**PKC** : Protein Kinase C  
**PI3K** : Phosphatidyl inositol 3 Kinase  
**PLCγ** : Phospho-Lipase C γ  
**PMA** : Phorbol Myristate Acetate  
**PS** : PreSenilin  
**PSI** : Plexin Semaphorin Integrin  
**PTB** : Phosphotyrosine Binding  
**REL-A** : ReticuloEndotheLiosis oncogene  
**RET** : Rearranged during Transfection  
**RIP** : Regulated Intramembrane Proteolysis  
**ROCK-1** : Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1  
**RON (STK, SEA)** : Récepteur d'Origine Nantais  
**S2P** : Site 2 Protease  
**SEMA** : SEMAphorin  
**SH** : Src Homology  
**SHC** : Src Homology 2 domain-Containing  
**SHP2** : Src homology 2-containing tyrosine phosphatase  
**SMAC** : Second Mitochondria-derived Activator of Caspases  
**SOS** : Son-Of-Sevenless  
**SPH** : Serin Protease Homologues  
**SPP** : Signal-Peptide Peptidase  
**STAT** : Signal Transducers and Activator of Transcription  
**SIDA** : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis  
**SMRT** : Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor  
**TACE** : TNF-α Converting Enzyme  
**TAB2** : TAK1-binding protein 2  
**TAK1** : Transforming growth factor β Activated Kinase 1  
**TGFα** : Transforming Growth Factor α  
**TIMP** : Tissue Inhibitor of MetalloProteinase  
**TNFα** : Tumor Necrosis Factor α  
**TPR** : Translocated Promoter Region  
**TRAF** : TNF Receptor-Associated Factor  
**TRAIL** : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand  
**TRAPS** : TNF-Receptor-Associated Periodic febrile Syndrome  
**TRK** : Tyrosine Receptor Kinase  
**UIM** : Ubiquitin Interacting Motif  
**Unc5H2** : UNCoordinated 5H2  
**u-PA** : urokinase- type Plasminogen Activator  
**UV** : UltraViolet

# INTRODUCTION

## Première partie : MET et HGF/SF : structure, fonction et signalisation

### **I. MET, récepteur tyrosine kinase au facteur de croissance HGF/SF**

#### **A. Le récepteur tyrosine kinase MET**

##### **1. Sa découverte**

En 1984, Cooper et son équipe découvrent MET sous la forme d'un oncogène activé (TPR-MET) dans une lignée de cellules dérivées d'ostéosarcome humain et transformées par un carcinogène chimique [1]. Les ADNc issus de ces cellules sont introduits dans des fibroblastes NIH3T3, permettant alors d'isoler la séquence de TPR-MET [2]. TPR-MET est caractérisé comme le résultat du réarrangement chromosomique entre un fragment du chromosome 1 portant le gène *tpr* (pour « translocated promoter region ») et un fragment du chromosome 7 portant le gène *c-met* [1-3]. Le gène *tpr* code une protéine du nucléopore possédant un domaine de dimérisation [4]. Quant au gène *c-met*, il semble coder une protéine de la famille des récepteurs tyrosine kinase aux facteurs de croissance, le récepteur MET [3].

##### **2. Du gène à la protéine**

Le gène humain *c-met* est localisé sur le chromosome 7 bande 7q21-q31 et couvre plus de 120 kb, répartis en 21 exons séparés de 20 introns [5]. Le transcrit primaire de *met* produit un polypeptide de 150 kDa, partiellement glycosylé pour donner un précurseur de 170 kDa [3]. Lors de sa maturation, il est glycosylé puis clivé par la protéase furine en deux sous-unités  $\alpha$  de 50 kDa et  $\beta$  de 140 kDa, qui restent associées par des ponts disulfures. Alors que la sous-unité  $\alpha$  est exclusivement extracellulaire, la sous-unité  $\beta$  est composée d'une région extracellulaire N-terminale, d'un domaine transmembranaire unique nécessaire à l'ancrage du récepteur à la membrane plasmique et d'une région intracellulaire C-terminale portant l'activité tyrosine kinase.

### 3. Sa structure

La chaîne  $\alpha$  complète et les 200 acides aminés N-terminaux de la chaîne  $\beta$  forment le domaine Sema, homologue à certains domaines retrouvés dans les sémaphorines et les plexines (Figure 1) [6]. La cristallographie révèle une structure à 7 pales d'hélice concentriques, composées de 4 feuillets  $\beta$  antiparallèles [7, 8]. La chaîne  $\beta$  contient ensuite un domaine PSI, couvrant 50 résidus, riche en cystéines. Les domaines PSI sont également trouvés dans les plexines, les sémaphorines et les intégrines, d'où leur nom [9]. Le domaine PSI de MET est connecté à l'hélice transmembranaire *via* 4 domaines homologues aux Immunoglobulines. La partie C-terminale intracellulaire de MET contient le domaine kinase à l'architecture classique des protéines kinases, à savoir une structure bilobée contenant de nombreux feuillets  $\beta$  côté N-terminal articulés à une hélice  $\alpha$  côté C-terminal [10].

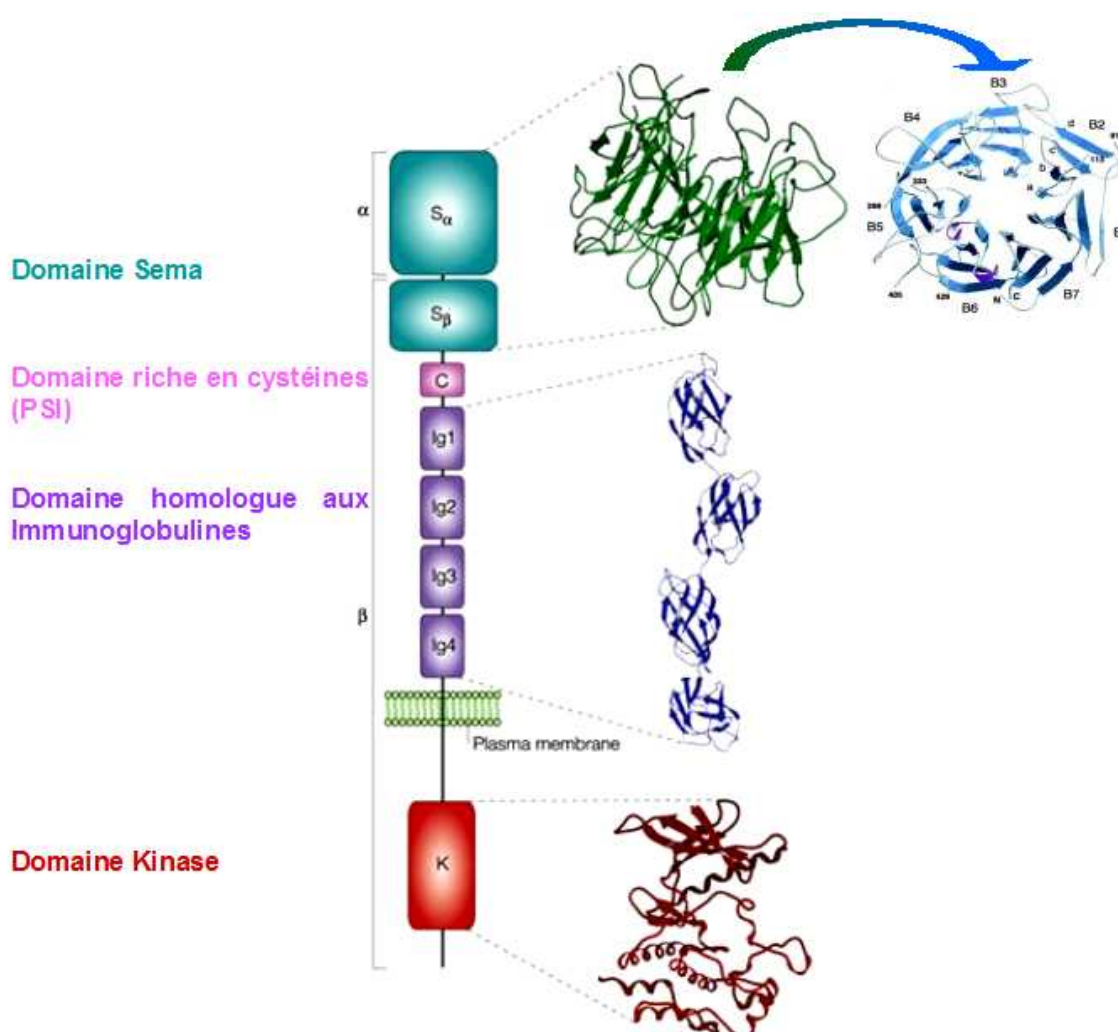


Figure 1 : Structure et modèle tri-dimensionnel des domaines du récepteur MET.  
Tiré de Birchmeier et al., 2003 [11]

## ***B. L'Hepatocyte Growth Factor ou Scatter Factor***

### **1. Sa découverte**

En 1984, un nouveau facteur de croissance est isolé à partir de serum de rats ayant subi une hépatectomie partielle [12]. Ce facteur est nommé HGF (Hepatocyte Growth Factor) pour sa capacité à induire la prolifération d'hépatocytes en culture. Trois ans plus tard, à partir de surnageant de fibroblastes d'embryon humain en culture, un autre facteur baptisé SF (Scatter Factor) est identifié par sa capacité à dissocier et induire la migration de cellules épithéliales [13]. Bien qu'initialement identifiés comme des molécules distinctes, en 1991, l'HGF et le SF ne font plus qu'un, l'HGF/SF. En effet, Naldini et ses collaborateurs montrent que leurs séquences codantes sont identiques et que leurs réponses biologiques de prolifération et de dispersion sont interchangeables, et ce, avec une efficacité similaire [14].

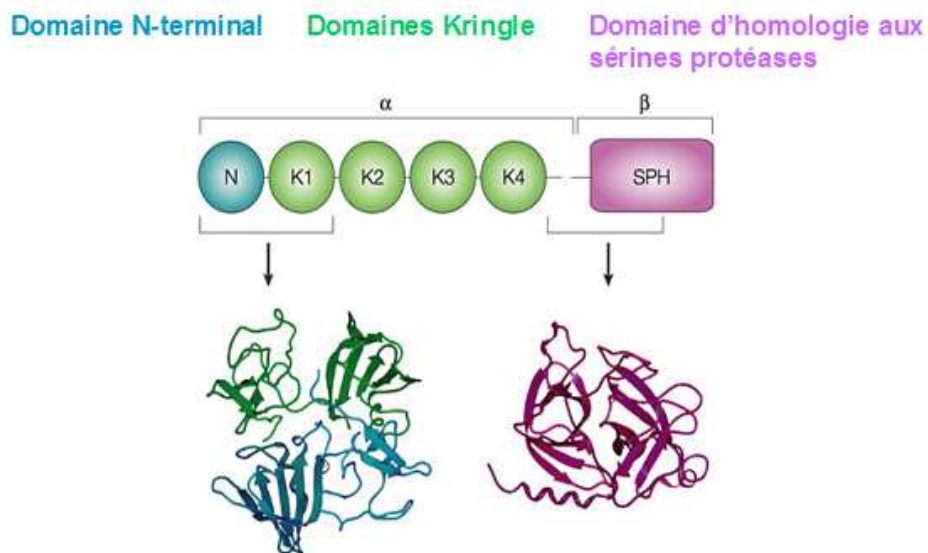
### **2. Du gène à la protéine**

Le gène codant l'HGF/SF couvre approximativement 70 kb sur le chromosome 7q21.1 et est composé de 18 exons et 17 introns [15].

L'HGF/SF est d'abord secrété comme une glycoprotéine sous forme de précurseur inactif à une chaîne. Pour devenir biologiquement actif, le précurseur de l'HGF/SF subit un clivage protéolytique unique générant une forme à deux chaînes [16, 17]. Plusieurs sérine protéases sont capables d'activer l'HGF/SF, comme l'activateur de l'HGF (HGF Activator) [18], l'u-PA (urokinase-type plasminogen activator), la matriptase ou l'hepsine [19]. La protéine hétérodimérique fonctionnelle est ainsi composée d'une sous-unité  $\alpha$  de 69 kDa et d'une sous-unité  $\beta$  de 34 kDa, reliées par des ponts disulfures [20].

### **3. Sa structure**

L'HGF/SF est constitué de 6 domaines (Figure 2): un domaine N-terminal (N), suivi de 4 copies d'un domaine kringle (domaine dans lequel un ensemble de boucles est stabilisé par un pont disulfure) (K1-K4), et un domaine C-terminal apparenté au domaine catalytique de sérine protéinases (SPH), mais dépourvu d'activité enzymatique [21]. Le domaine SPH constitue à lui seul la chaîne  $\beta$ , la sous-unité  $\alpha$  couvrant la région N-terminale et les 4 domaines kringle.



**Figure 2 : Structure et modèle tri-dimensionnel des domaines de l'HGF/SF.**  
Tiré de Birchmeier et al., 2003 [11]

### ***C. L'HGF/SF, un ligand pour MET***

Le récepteur MET reste orphelin de son ligand jusqu'en 1991, date à laquelle deux équipes montrent que l'HGF/SF se lie à MET et en induit la phosphorylation. L'HGF/SF est donc le ligand du récepteur MET [14, 22].

En effet, MET est le récepteur à haute affinité de l'HGF/SF ( $kD = 5-25 \text{ pM}$ ) [14, 23] et cette interaction nécessite le domaine Sema de MET [24]. Il existe deux sites d'interaction d'affinité différente entre l'HGF/SF et le domaine Sema de MET. Le premier implique les domaines N et K1 de la chaîne  $\alpha$  de l'HGF/SF et est responsable de l'interaction à haute affinité avec MET ( $kD = 20-30 \text{ pM}$ ) [25]. Le second se situe sur la chaîne  $\beta$  de l'HGF/SF, qui interagit également avec le domaine Sema de MET, mais avec une plus faible affinité ( $kD = 90 \text{ nM}$ ) [8]. D'autre part, il existe, à la surface des cellules, des co-récepteurs de basse affinité pour l'HGF/SF ( $kD = 0.2-5 \text{ nM}$ ). Il s'agit de protéoglycanes sulfatés de type héparanes sulfates [14].

## II. Implication du couple HGF/SF-MET dans la mise en place et l'homéostasie des tissus épithéliaux

### A. Lors du développement embryonnaire

L'HGF/SF et MET sont exprimés de manière précoce au cours de l'embryogenèse (stade blastula). Lors de la gastrulation (6,5 à 7 jours de développement), l'expression conjointe de l'HGF/SF et MET est trouvée dans le mésoderme dérivé de la blastula et entourant l'endoderme, suggérant un mode d'action autocrine. Pendant l'organogenèse (8-10 jours 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 dans les cellules épithéliales, endothéliales et myogéniques adjacentes, indiquant plutôt un mode d'action paracrine [26]. Cette spécificité suggère que le couple HGF/SF-MET joue alors un rôle important dans les interactions épithélium-mésenchyme.

L'extinction du gène codant MET ou l'HGF/SF démontre leur rôle essentiel lors du développement, puisque les souris MET<sup>-/-</sup> ou HGF/SF<sup>-/-</sup> meurent *in utero* au même stade embryonnaire, environ 15 jours de développement, et présentent des défauts similaires de désorganisation du placenta, réduction de la taille du foie et absence des muscles squelettiques (Figure 3) [27-29].

#### 1. Migration des précurseurs musculaires

Chez les souris Knock-Out (KO) pour *met* ou *hgf*, les muscles squelettiques sont absents des bourgeons des membres, alors que d'autres groupes musculaires se développent normalement. Ces muscles se forment à partir de la différenciation et la migration de précurseurs issus du dermomyotome, une structure épithéliale qui se développe à partir des somites par une transition épithélium-mésenchyme (Figure 3A). Chez les souris KO pour *met* ou *hgf*, ces précurseurs, exprimant habituellement MET [30], existent au niveau du dermomyotome mais y restent car ils sont incapables de migrer et de coloniser les organes où l'HGF/SF est exprimé [27]. Ainsi, l'HGF/SF et MET semblent réguler le détachement et la migration des précurseurs myogéniques à partir du dermomyotome *in vivo*, un processus proche de la réponse cellulaire de dispersion qui a permis d'identifier le SF à partir de culture cellulaire [13].



## **2. Interaction épithélium-mésenchyme au niveau du placenta**

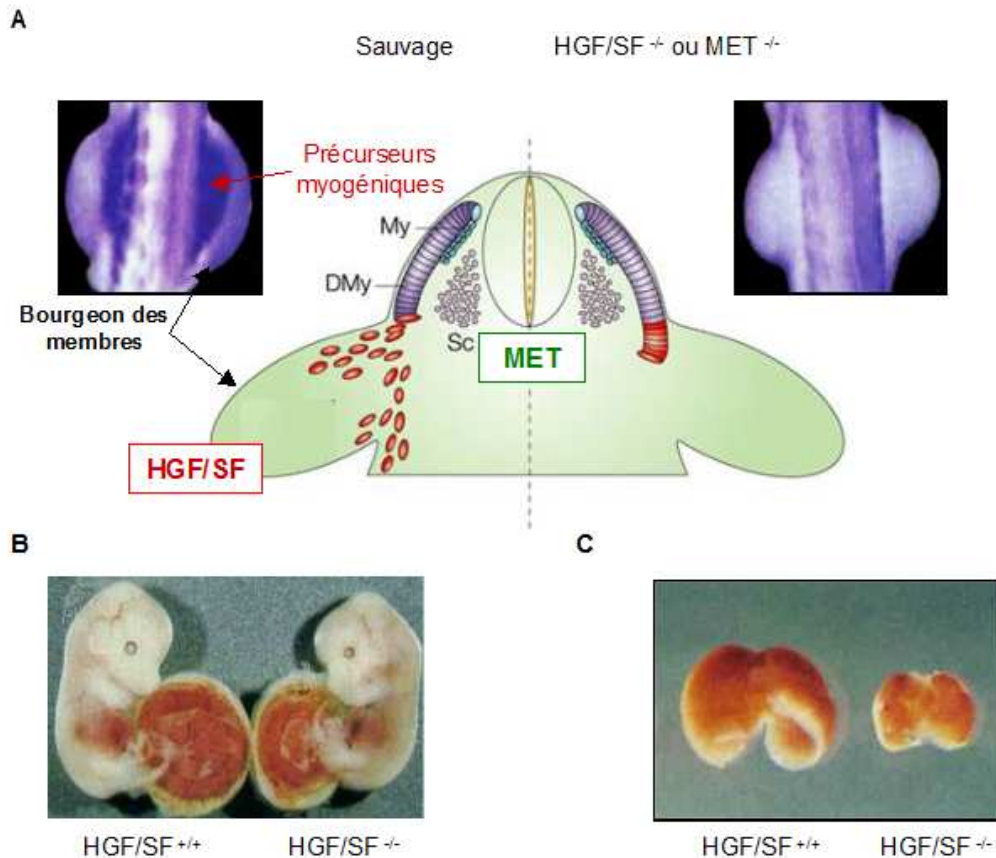
Les défauts au niveau du placenta chez les souris KO pour *met* ou *hgf*, notamment l'absence totale du développement du trophoblaste labyrinthique, semblent être responsables de la mort des embryons, sans doute à cause d'un dysfonctionnement du transport des nutriments et de l'oxygène (Figure 3B) [28, 29]. Une interaction épithélium-mésenchyme, impliquant des signaux paracrines, conduit à la prolifération et différenciation de la couche épithéliale en trophoblaste labyrinthique. Puisque ce trophoblaste est absent dans les souris HGF/SF<sup>-/-</sup> et MET<sup>-/-</sup>, il est probable que l'HGF/SF sécrété par le mésenchyme allantoïque et son récepteur MET exprimé dans le trophoblaste participent aux signaux paracrines permettant le développement du placenta de souris (Figure 3B). Ainsi, l'inactivation du gène *hgf* [28, 29] ou celui de *met* [27] empêcherait le contrôle de la prolifération et de la différenciation du trophoblaste par le mésenchyme. Ces résultats confirment en outre l'hypothèse initiale issue de la localisation complémentaire de l'HGF/SF et MET quant à leur rôle dans les interactions épithélium-mésenchyme [31].

## **3. Développement du système nerveux**

Les fonctions possibles de l'HGF/SF dans le développement du système nerveux ont d'abord été suggérées par Stern et ses collaborateurs, qui montrèrent que l'application ectopique d'HGF/SF à un embryon de poulet induit la formation d'une plaque neurale [32]. En fait, il apparaît que MET et l'HGF/SF sont importants dans le développement du système nerveux, par des effets de survie, de différenciation et de croissance axonale [33]. En effet, l'innervation des membres par les motoneurones et les neurones sensoriels issus du tube neural est perturbée dans des souris exprimant un MET inactivé [34]. L'HGF/SF exprimé au niveau de l'ébauche des membres, en collaboration avec des neurotrophines, permettrait la survie et l'adressage des neurones vers les membres [33, 35].

## **4. Survie des hépatocytes**

Les embryons des souris KO pour *met* présentent également une taille réduite du foie, due à une grande diminution du nombre d'hépatocytes provoquée par une apoptose massive, sans que sa structure globale ne soit affectée (Figure 3C) [28]. Cette analyse a appuyé le rôle de survie de MET et est également en accord avec le puissant effet mitogène obtenu par l'HGF/SF sur les hépatocytes.



**Figure 3 : Rôles de l'HGF/SF et MET dans le développement embryonnaire.**

A – Schéma du développement des muscles des bourgeons des membres et détection des précurseurs myogéniques chez des embryons de 9,5 j de développement : My : Myotome ; Dmy : Dermomyotome; Sc: Sclérotome (Tiré de Birchmeier et al., 2003 [11] et Bladt et al., 1995 [27]). B - HGF/SF dans le développement du placenta : Apparence externe d'embryons de souris à 13,5 j de développement (Tiré de Uehara et al., 1995 [29]). C - Apparence externe des foies d'embryons de souris à 14,5 j de développement (Tiré de Schmidt et al., 1995 [28]).

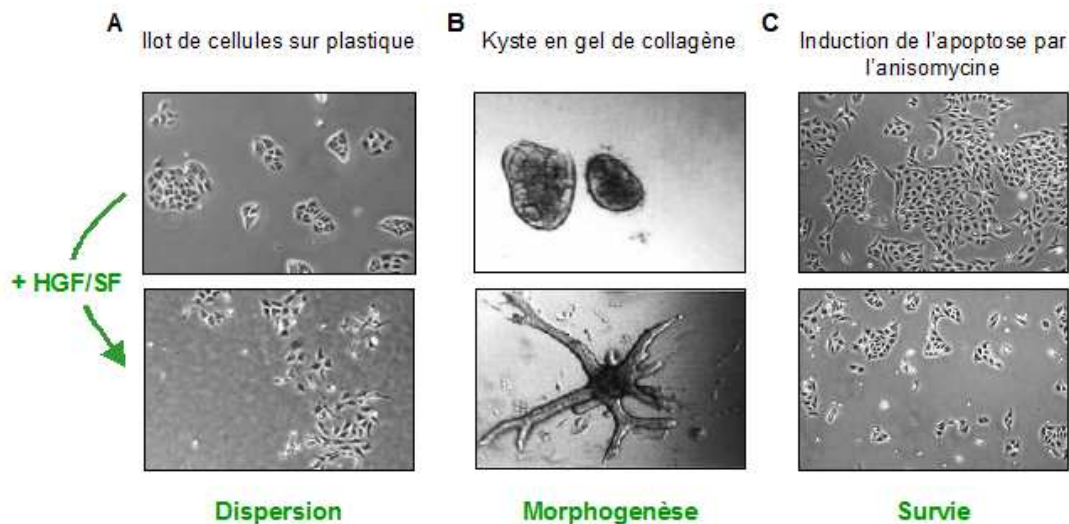
### **B. Chez l'adulte**

L'HGF/SF et MET sont largement exprimés dans les tissus adultes et sont impliqués dans des processus physiologiques post-nataux et pathophysiologiques. Par exemple, après blessure du foie, du rein ou du cœur, le niveau d'HGF/SF augmente dans le plasma ainsi que dans les organes endommagés [36-39]. Ainsi, l'augmentation de l'HGF/SF pourrait faire partie d'une réponse générale de défense physiologique à un dommage tissulaire grâce aux différentes capacités de l'HGF/SF. Déjà, différentes expériences appuient l'idée que l'HGF/SF est un puissant mitogène du foie *in vivo* puisque l'application ectopique ou l'expression transgénique d'HGF/SF stimule la prolifération des hépatocytes, augmente la taille globale du foie et améliore la régénération du foie [36]. Ensuite, l'HGF/SF permet la formation de certains organes. En effet, l'HGF/SF stimule la tubulogenèse dans le foie et le rein durant une régénération d'organe après une hépatectomie partielle ou des dommages rénaux [40, 41]. Enfin, l'HGF/SF a une activité de protection et de survie *in vivo*, et

l'application ectopique avant ou juste après une blessure tissulaire protège de différents dommages [37, 42]. Alors que l'extinction du récepteur MET dans un foie adulte, en utilisant un système Cre-lox, n'affecte pas les fonctions des hépatocytes en conditions physiologiques, leur réponse suite à une blessure est gravement affectée [43-45]. En effet, les hépatocytes dérivés de ces souris sont sensibilisés à l'apoptose induite par le récepteur de mort Fas et la régénération du foie n'a pas lieu suite à une hépatectomie partielle [43, 44].

### **C. Les effets de l'HGF/SF sur des cellules en culture**

En accord avec le rôle que joue l'HGF/SF *via* MET *in vivo*, il induit de nombreuses réponses biologiques sur des cellules en culture (Figure 4). L'HGF/SF est un puissant mitogène pour les hépatocytes. Cette activité a largement été confirmée pour de nombreux types cellulaires épithéliaux et endothéliaux [46]. L'HGF/SF est capable d'induire la dispersion de nombreux types cellulaires, correspondant à des modifications morphologiques séquentielles : les cellules s'étalent, perdent les jonctions qui les unissent, acquièrent un phénotype fibroblastoïde et migrent activement [46]. L'HGF/SF peut stimuler des effets de morphogenèse lorsque les cellules sont cultivées en présence de composants de la matrice extracellulaire. Ainsi, sur des cellules épithéliales cultivées pendant plusieurs jours en gel de collagène et formant des kystes, l'addition d'HGF/SF entraîne la formation de branchements au sein du gel [47]. Sous l'effet de l'HGF/SF, de nombreuses lignées cellulaires sont capables de reproduire *in vitro* des structures proches de leur tissu d'origine : structures cystiques par des cellules d'adénocarcinome pancréatique, tubulaires par des cellules épithéliales mammaires ou encore d'allure alvéolaire par des cellules de carcinome pulmonaire [48]. Ainsi, l'HGF/SF favorise les potentialités morphogènes de cellules épithéliales. De plus, l'HGF/SF protège de la mort cellulaire induite dans des conditions variées. En effet, il favorise la survie des cellules neuronales en culture et protège de l'apoptose induite par le détachement de cellules (anoïkis), la privation en serum, des cytokines telles que le TNF $\alpha$ , les UV ou l'activation des récepteurs de mort [49-52]. En induisant ces différentes réponses biologiques, l'HGF/SF contrôle un programme biologique plus complexe nommé croissance invasive [53, 54]. En effet, ce seul processus résulte de l'intégration de la dissociation cellulaire, la migration dans la matrice extracellulaire, la croissance, l'acquisition de polarité, la formation de tubule et la survie. Par ses différentes facettes, la croissance invasive est impliquée dans un grand nombre d'évènements physiologiques et pathologiques.



**Figure 4 : Réponses biologiques de l'HGF/SF et MET sur des cultures de cellules épithéliales MDCK (Madin-Darby Canine Kidney).**

A – Les cellules ont été ensemencées à basse densité et incubées pendant 24 h en absence ou en présence de 10 ng/ml d'HGF/SF. B – Les cellules ont été ensemencées en gel de collagène pendant 6 jours en absence ou en présence de 0,2 nM d'HGF/SF (Tiré de Prat et al., 1998 [55]). C – Les cellules ont été incubées avec de l'HGF/SF (30 ng/ml) et/ou de l'anisomycine (50  $\mu$ M) en milieu dépourvu de serum pendant 8 h.

### III. Le réseau de signalisation de l'HGF/SF et MET

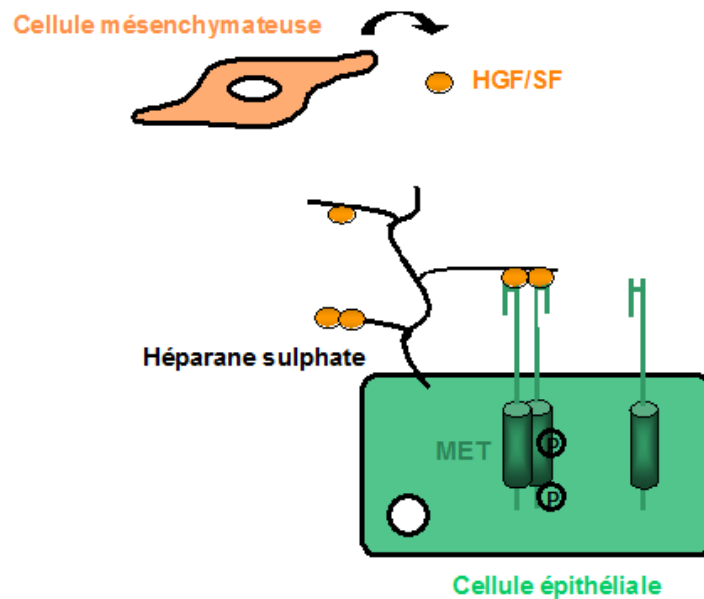
#### A. L'HGF/SF active son récepteur MET

##### 1. Interaction entre MET et l'HGF/SF

Même si les formes active et inactive du ligand sont capables de lier le récepteur MET avec la même affinité, seule la forme mature de l'HGF/SF peut l'activer [21, 56]. A ce jour, il semble que la dimérisation de MET est réalisée sous forme d'un complexe quaternaire 2:2 : une molécule d'HGF/SF se fixe au récepteur monomérique, ce qui induit la dimérisation de 2 molécules d'HGF/SF, entraînant chacun un récepteur MET, les conduisant à se dimériser (Figure 5) [57].

Comme nous l'avons vu précédemment, l'HGF/SF peut se lier aux héparanes sulfates. Cette interaction n'est pas essentielle pour l'activation du récepteur mais peut faciliter le mécanisme de dimérisation, et donc d'activation de MET [58-60]. En effet, ces protéoglycanes sulfatés favoriseraient l'organisation des molécules d'HGF/SF en structures oligomériques, permettant ainsi une dimérisation des récepteurs MET plus rapide [58]. De plus, cette liaison limiterait la diffusion du facteur *in vivo*. En effet, nous avons vu que

l'HGF/SF est secrété par les cellules mésenchymateuses alors que son récepteur MET est exprimé principalement à la surface des cellules épithéliales adjacentes (Figure 5).



**Figure 5 : Modèle de dimérisation du récepteur tyrosine kinase MET .**  
Tiré de Dickson et al., 2000 [61]

## 2. Activation de MET

La dimérisation de MET induite par son ligand l'HGF/SF découle directement sur son activation, consistant en l'autophosphorylation de résidus tyrosine répartis tout le long de son domaine intracellulaire. Cette région est divisée en trois domaines qui jouent chacun, grâce à la phosphorylation de leurs tyrosines, un rôle particulier dans la signalisation du couple HGF/SF-MET (Figure 6).

### a) *Domaine kinase catalytique et régulation positive*

Lorsqu'il est dimérisé et activé, MET s'autophosphoryle sur deux résidus tyrosine adjacents Y8 et Y9 (les tyrosines intracellulaires de MET sont numérotées de 1 à 16), localisés dans la boucle d'activation du domaine kinase (Figure 6). Ces tyrosines correspondent au site majeur d'autophosphorylation du récepteur [62]. Leur phosphorylation stimule l'activité kinase intrinsèque de MET [14, 63]; elles sont donc indispensables à l'activité catalytique du récepteur. En effet, la mutation de ces résidus abolit toute activité du récepteur MET [64].

### *b) Domaine C-terminal et transduction du signal*

L'activation de MET permet également l'autophosphorylation d'autres résidus localisés dans la région C-terminale du récepteur. Ces tyrosines, Y14 et Y15, constituent le site de recrutement multisubstrat du récepteur, c'est-à-dire que c'est *via* ces deux résidus que MET recrute la majeure partie de ses protéines de signalisation (Figure 6). Les substrats de MET sont des protéines capables de lier des tyrosines phosphorylées et caractérisées par la présence de domaines spécifiques, tels que les domaines SH2 (Src Homology 2), PTB (Phosphotyrosine Binding) et SH3 (Src Homology 3). Pour étudier le rôle de ces tyrosines *in vivo*, des expériences de knock-in ont été réalisées en remplaçant le gène codant MET par une séquence codant une protéine dont les tyrosines 14 et 15 ont été remplacées par des résidus non phosphorylables (MET Y14/15<sup>-/-</sup>). Les souris exprimant de tels récepteurs meurent avant la naissance et présentent des défauts similaires à ceux des souris n'exprimant pas le récepteur. Ces résultats montrent de façon claire que le site d'ancrage joue un rôle crucial pour les fonctions initiées par MET durant le développement [34]. Néanmoins, il a été montré que des signaux peuvent être médiés par MET sans ce site de recrutement multisubstrat, permettant d'affirmer que bien que responsable majeur de la signalisation de MET, il n'est pas le seul mécanisme par lequel MET peut transmettre une signalisation [65].

### *c) Domaine juxtamembranaire et régulation négative*

Le récepteur MET s'autophosphoryle également sur la tyrosine Y1001 (Y2) de la région juxtamembranaire (Figure 6). Son rôle dans la dégradation du récepteur MET, que nous détaillerons par la suite, ainsi que le fait que sa mutation entraîne une activation constitutive du récepteur permettent de la classer comme une tyrosine inhibitrice [66, 67]. D'autres sites de régulation négative siègent au niveau du domaine juxtamembranaire : un site de phosphorylation par la protéine kinase C, la Sérine 983, qui régule négativement l'activité tyrosine kinase du récepteur [68, 69]; une séquence PEST (AA 986 à 1001) qui apporte une sensibilité aux protéases intracellulaires [70].

Ce domaine juxtamembranaire est contenu dans la séquence codée par l'exon 14. De façon intéressante, chez la souris, cet exon subit un épissage alternatif, ce qui conduit à un recrutement plus efficace de protéines de signalisation [71]. De plus, la fusion TPR-MET ne possède pas cet exon et sa réintroduction abolit les capacités transformantes de l'oncogène [72]. L'ensemble de ces observations confirment le rôle de régulation négative que porte ce domaine juxtamembranaire de MET.

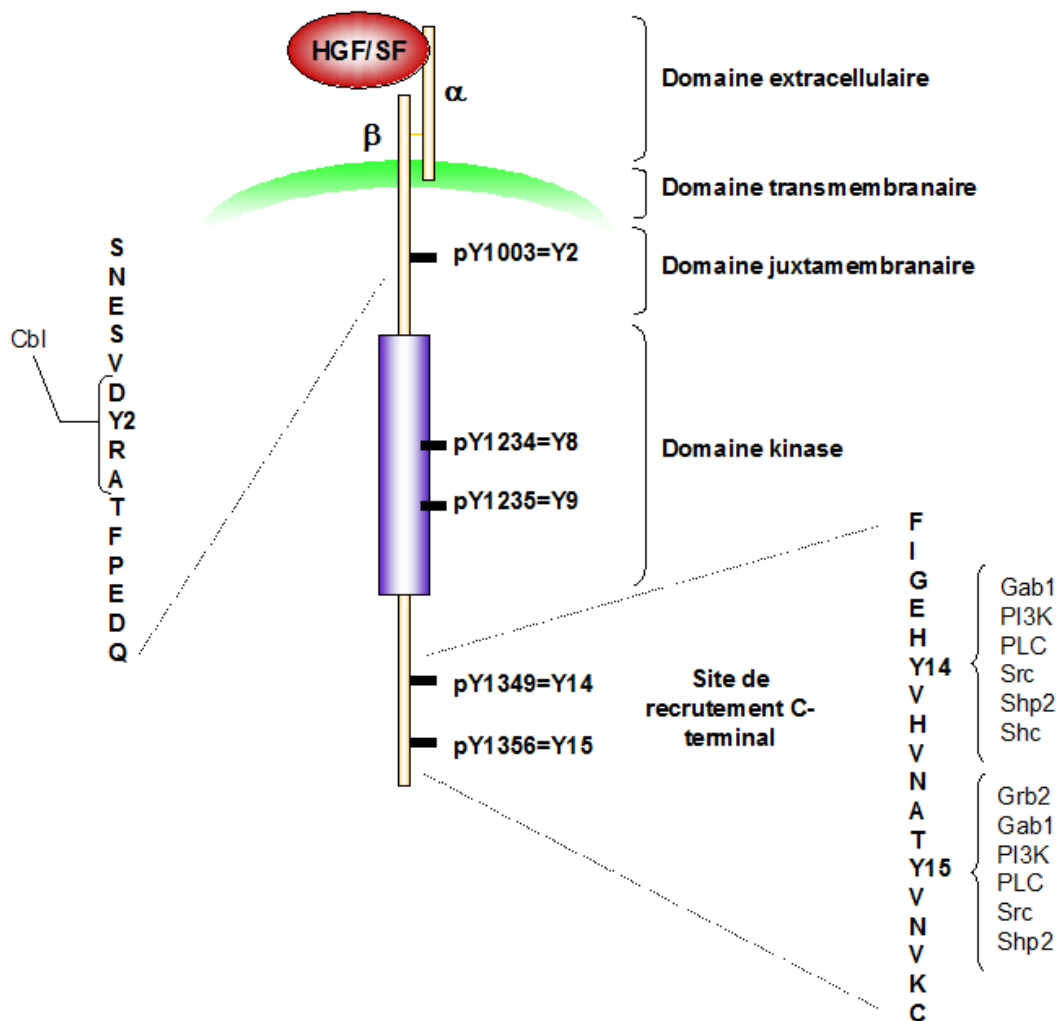


Figure 6 : Les principales tyrosines phosphorylées du récepteur MET.  
Tiré de Birchmeier et al., 2003 [11]

### **B. Signalisation de l'HGF/SF et MET : un travail à la chaîne**

Une fois le récepteur MET activé par l'HGF/SF, de nombreuses protéines de signalisation vont être sollicitées pour mettre en place ses réponses biologiques. L'ensemble de ces protéines vont créer un réseau dans lequel la régulation qualitative (spécificité fonctionnelle de chaque protéine) compte tout autant que la régulation quantitative (intensité et durée d'activation de chaque protéine). Ainsi, les réponses biologiques résultent de l'intégration des différents membres du réseau. Nous allons voir que les protéines en aval de MET ont deux fonctions majeures : celle de recruter d'autres partenaires, ce sont des adaptateurs qui permettent d'amplifier le signal ou de l'orienter, et celle d'activer d'autres protéines en aval, ce sont des relais de cascades de signalisation. La signalisation de MET impliquant un grand nombre d'acteurs interagissant les uns avec les autres, nous nous servirons de quelques exemples représentatifs pour décrire le réseau de signalisation mis en place.

## 1. Un réseau bien organisé

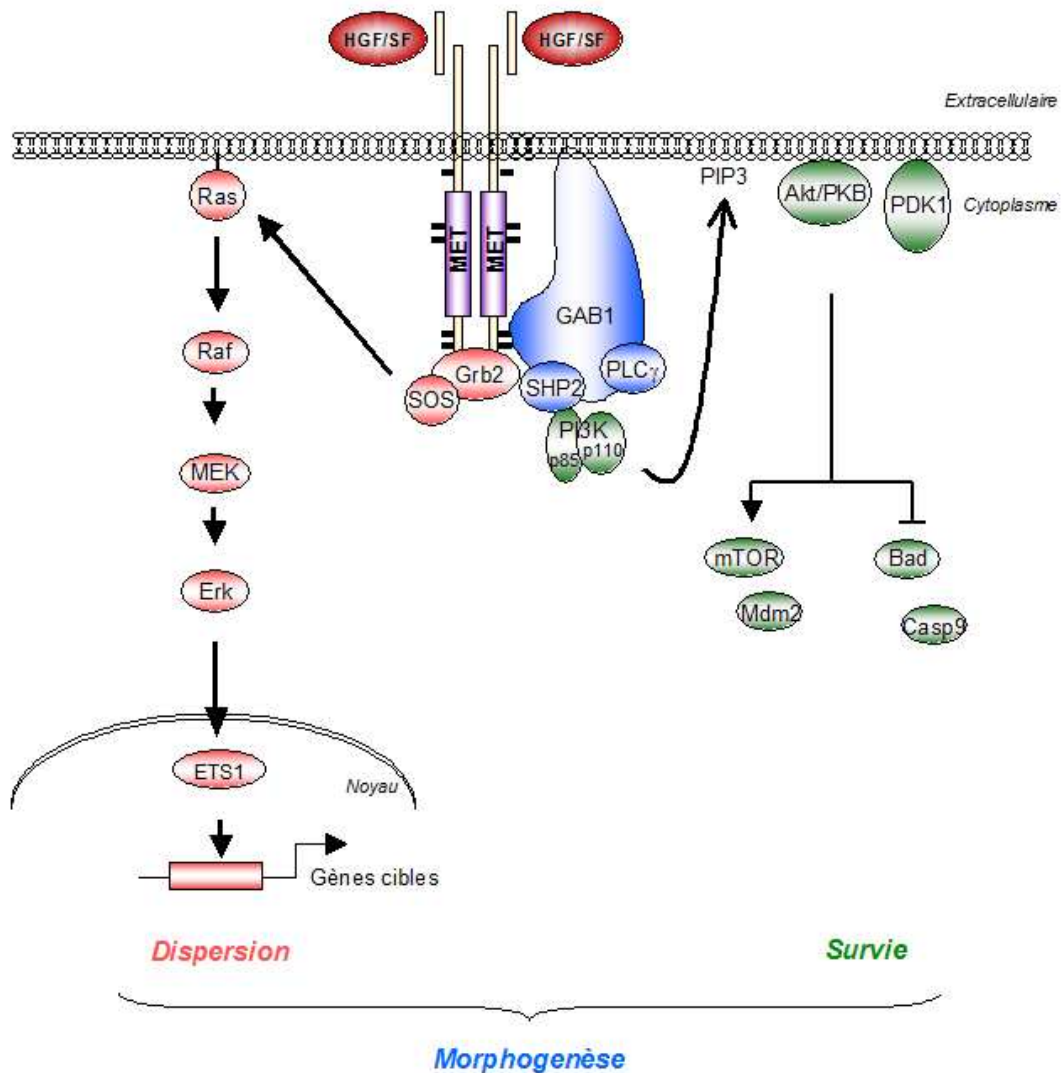


Figure 7 : Exemples de voies de signalisation initiées par MET.

### a) Cascades de signalisation Grb2-Ras-MAPK et PI3K-Akt

La voie de signalisation Grb2-Ras-MAPK-ERK représente un archétype de signalisation en cascade (Figure 7). Suite à l'activation de MET par l'HGF/SF, Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) peut s'associer à MET directement au niveau d'un site consensus situé autour de la tyrosine Y15 [65, 73-75] ou indirectement *via* la protéine adaptatrice Shc [76]. Le complexe Grb2/SOS est alors transloqué à la membrane où SOS peut promouvoir l'échange du GDP en GTP sur Ras, une petite protéine G localisée à la membrane. La protéine Ras-GTP initie l'activation en relais d'un module de MAPkinases : RAF-MEK-ERK, activant à son tour des protéines cytoplasmiques ou nucléaires telles que le facteur de transcription ETS1 (E-twenty six) [77, 78]. L'activation de cette voie Ras- ERK en aval de MET est nécessaire pour le désassemblage des jonctions d'adhérence et la motilité



(ou dispersion), la prolifération et la tubulogénèse induits par MET [79-82]. La réponse biologique effective dépend de la cinétique d'activation de cette voie : une activation soutenue de ERK est requise pour la morphogénèse de branchement alors qu'une transitoire l'est pour la motilité cellulaire [78, 79].

Une autre cascade de signalisation représentative est celle initiée par la PI3K (Phosphatidylinositol 3 kinase). La PI3K est une enzyme comprenant 2 sous-unités : une unité catalytique (p110), et une unité régulatrice (p85) [83]. L'activation de MET permet le recrutement direct de p85 PI3K par le domaine multisubstrat (Y14 et Y15) [84]. La PI3K produit du phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate (PIP3), un second messenger lipidique qui contrôle un grand nombre de réponses cellulaires. Le PIP3 va permettre la translocation à la membrane de la protéine Akt/PKB, ce qui conduit à son hétérodimérisation avec PDK1 (3' phosphoinositide-dependent kinase) et son activation par phosphorylation sur des résidus Sérine et Thréonine. Le domaine sérine/thréonine kinase de Akt actif va permettre de phosphoryler de nombreuses cibles et de médier ses effets biologiques tels que la protection contre l'apoptose [85]. En effet, la voie PI3K/Akt joue un rôle central dans les réponses anti-apoptotiques induites par l'activation de MET médiée par l'HGF/SF dans nombre de types cellulaires et en réponse à divers inducteurs d'apoptose (Figure 7) [86, 87, 88, Mildner, 2002 #14, 89].

#### *b) Gab1 plateforme de la signalisation*

La protéine Gab1 est une large protéine adaptatrice impliquée dans la signalisation du complexe HGF/SF-MET. En effet, Gab1 s'associe directement sur la tyrosine 14 du récepteur MET *via* son domaine C-terminal MBD (MET Binding Domain) [90], et indirectement sur la tyrosine 15 *via* la protéine Grb2 [91]. La stimulation par l'HGF/SF induit la phosphorylation de Gab1 conduisant au recrutement de nombreux partenaires de signalisation tels que PI3K, PLC $\gamma$  et SHP2 [92]. Le rôle de Gab1 dans la signalisation induite par l'HGF/SF et MET est très important comme en témoignent les souris déficientes en Gab1 : les anomalies observées chez les souris Gab1<sup>-/-</sup> sont celles présentes chez les souris MET<sup>-/-</sup>, mais sous une forme plus atténuée [93]. Ce rôle clé de Gab1 s'explique par sa fonction de plateforme de recrutement qui lui permet d'activer des voies de signalisation que MET ne pourrait activer seul ou de moduler leur durée d'activation.

Par exemple, la capacité de l'HGF/SF à induire la morphogénèse de branchement serait issue des voies de signalisation médiées par Gab1. En effet, des mutants de Gab1 incapables de lier PLC $\gamma$  [94] ou Shp2 [79, 95] empêchent la morphogénèse induite par l'HGF/SF. Gab1 est capable d'activer de manière soutenue la voie MAPK-ERK, plutôt que

transitoire, *via* le recrutement de Shp2, ce qui permet à cette voie de jouer un rôle dans les réponses de morphogénèse induites par l'HGF/SF. De plus, Gab1, en recrutant PI3K directement, oriente ses fonctions également vers la morphogénèse plutôt que vers la survie. La surexpression de Gab1 inhibe la survie en réponse à l'HGF/SF, et ce de manière concomitante à l'inhibition de l'activation soutenue de Akt [96], alors qu'elle promeut la morphogénèse [97]. De plus, l'inhibition de l'activité PI3K ou l'utilisation de mutants de Gab1 incapables de lier PI3K diminue la capacité de Gab1 à induire des branchements [97, 98].

## 2. Signalisation lors du développement

Les voies de signalisation en aval de MET activé par son ligand nécessitent une fine régulation pour induire une réponse biologique spécifique. L'investigation de cette coordination a été envisagée par une approche génétique. En effet, le remplacement du gène *c-met* par des versions mutées, donnent des informations sur l'impact des voies de signalisation lors du développement embryonnaire. Nous avons déjà évoqué le rôle crucial du site de recrutement, et donc des tyrosines Y14 et Y15, dans les réponses biologiques induites par MET. Néanmoins, la spécificité de liaison d'un substrat sur un résidu tyrosine phosphorylé est également conditionnée par la séquence en acides aminés environnante. Ainsi, la modification des acides aminés entourant les tyrosines du site de recrutement multisubstrat permet de favoriser préférentiellement le recrutement d'une protéine telle que Src, PI3K ou Grb2 et d'en étudier les conséquences [99]. Le remplacement chez la souris du récepteur MET sauvage par ces récepteurs mutés a permis de montrer que chaque mutation a des conséquences différentes sur le développement, confirmant l'importance de recrutements multiples pour l'obtention des réponses biologiques [99].

Par ailleurs, le remplacement, chez la souris, de MET par une version mutante incapable de recruter spécifiquement une protéine de signalisation a également permis de révéler de nouvelles fonctions du récepteur. En effet, des souris exprimant un récepteur MET incapable de recruter Grb2 présentent une réduction des muscles des membres. Ce défaut correspond à un de ceux observés chez les souris MET<sup>-/-</sup>, alors que les autres dysfonctionnements ne sont pas retrouvés. Néanmoins, alors que dans les souris MET<sup>-/-</sup>, c'est la perte des capacités migratoires des myoblastes qui est responsable du phénotype, dans les souris Grb2<sup>-/-</sup>, c'est la prolifération des myoblastes durant leur migration qui est perturbée [100].

Ainsi, il est probable que les phénotypes dramatiques observés par l'inactivation des gènes *hgf/sf* et *met* masquent d'autres fonctions de ce couple.

### 3. Contrôle négatif du signal

Un des modes de régulation de la signalisation est une régulation négative par atténuation du signal. Ainsi, l'activation de MET par son ligand conduit également à sa dégradation rapide par le recrutement de la protéine Cbl, plateforme de signalisation mais aussi E3 ubiquitine ligase qui lui permet de lier l'ubiquitine à ses substrats [101]. Ainsi, après la liaison de l'HGF/SF, MET recrute CBL au niveau de la tyrosine Y2 phosphorylée du domaine juxtamembranaire (Figure 8) [67, 102]. Ce recrutement va permettre la formation d'un complexe entre MET, CBL, CIN85 et l'endophiline, enclenchant les premières étapes de l'internalisation du récepteur dans des puits recouverts de clathrine [103] par invagination et scission de la membrane [104]. CBL induit l'ubiquitinylation de MET, lui permettant alors de recruter un complexe protéique, dont la protéine Hrs (Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate) qui va emmener le récepteur activé vers les endosomes [105-107]. La fusion des endosomes avec les corps multivésiculaires conduit à la dégradation des vésicules et de leur contenu dans le lysosome. Cette dégradation de MET dépendant du ligand permet une régulation négative du récepteur, importante pour contrôler les réponses biologiques [67, 108, 109]. En effet, des mutants de MET au niveau de sa tyrosine Y2, incapables de recruter Cbl et d'être ubiquitylés, sont transformants et tumorigéniques, du fait d'une stabilité accrue de MET et d'une activation soutenue des voies de signalisation en aval [67, 107].

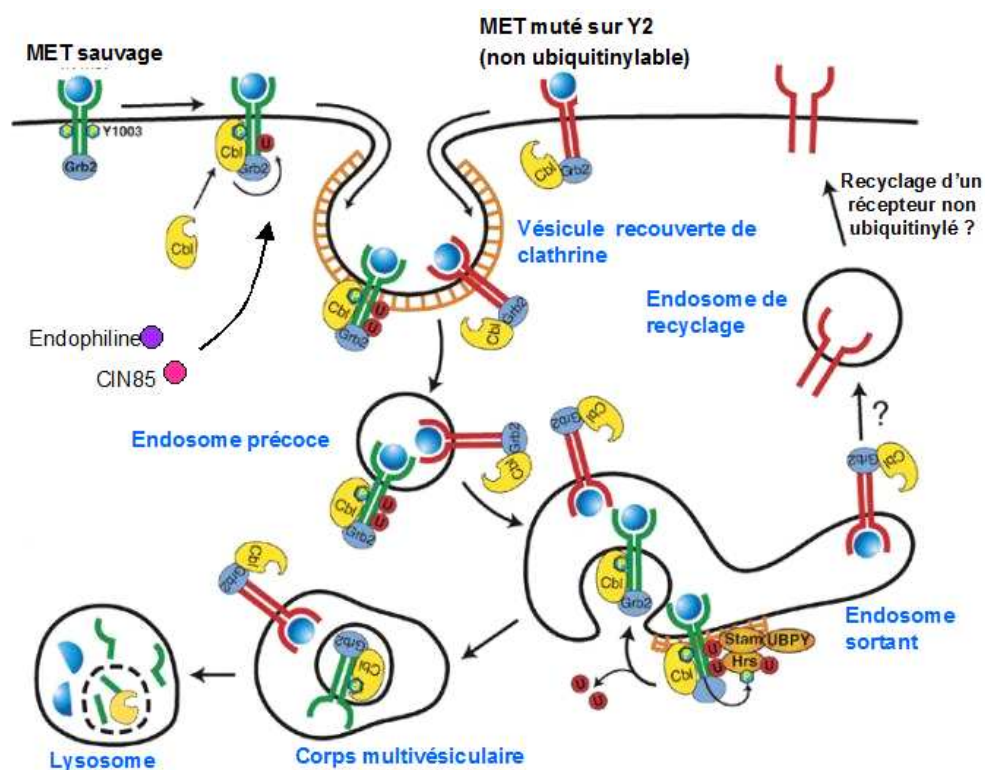


Figure 8 : Régulation de la dégradation de MET par l'HGF/SF.  
Tiré de Peschard et al., 2007 [110]

### **C. Cibles transcriptionnelles du couple HGF/SF-MET**

Il a été montré que la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, bloque de façon très précoce la dispersion induite par l'HGF/SF sur des cellules MDCK [82]. La synthèse de nouvelles protéines ou le renouvellement de protéines déjà présentes est donc indispensable pour cette réponse biologique. En quelques exemples, nous verrons que l'HGF/SF contrôle ses réponses biologiques en régulant également des acteurs de signalisation au niveau transcriptionnel.

#### **1. Des facteurs de transcription**

L'HGF/SF induit rapidement l'expression de gènes précoces (immediate early genes) *fos* [111] et *junB* [112] dans les cellules humaines, respectivement, de carcinome gastrique et de glioblastome, *via* une voie dépendant des MAPK [112]. Ces facteurs de transcription de la famille AP1, agissant en homo- ou hétérodimère, régulent de nombreux gènes et sont impliqués dans divers processus dont la prolifération et la différenciation cellulaire [113, 114]. Par exemple, il a été montré qu'après stimulation à l'HGF/SF, l'induction de l'expression de *c-fos* est corrélée à une réponse de prolifération mais pas à celle de motilité [111]. Il a également été montré que l'HGF/SF induit une augmentation de l'expression du facteur de transcription ETS1 dans des cellules MDCK [115]. Cette induction corrèle avec la migration et la morphogénèse des cellules épithéliales induites par l'HGF/SF.

#### **2. Protéases et inhibiteurs de protéases**

Les protéases de la matrice extracellulaire sont des enzymes qui dégradent certains de ses composants pour permettre aux cellules de se disperser et de migrer. Selon les types cellulaires, l'HGF/SF induit l'expression de diverses protéases dont les métalloprotéases MMP1 (matrix metalloprotease 1 ou collagénase) [116] et MMP9 (gélatinase B) [116] ou de sérine protéases comme l'uPA [115]. L'expression de l'uPA et de la MMP1 ou de la MMP9 corrèle avec l'induction de la dispersion des cellules MDCK ou des kératinocytes induite par l'HGF/SF, suggérant leur implication dans ce phénomène [115]. De plus, un anticorps bloquant dirigé contre la MMP-9 inhibe la dispersion induite par l'HGF/SF [117]. Par ailleurs, l'HGF/SF est également capable d'induire l'expression d'inhibiteurs de protéases tels que l'inhibiteur de protéases pai-1 (plasminogen activator inhibitor 1) [115] et timp-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase 3) [118], respectivement dans les cellules MDCK et des kératinocytes. La surexpression de TIMP-3 abolit la dispersion induite par l'HGF/SF et la perte de son expression pourrait augmenter le potentiel invasif de certaines tumeurs. Ainsi, l'HGF/SF peut réguler au niveau transcriptionnel la balance entre protéases et inhibiteurs de protéases pour la mise en place de ses réponses biologiques.

### **3. Molécules d'adhésion**

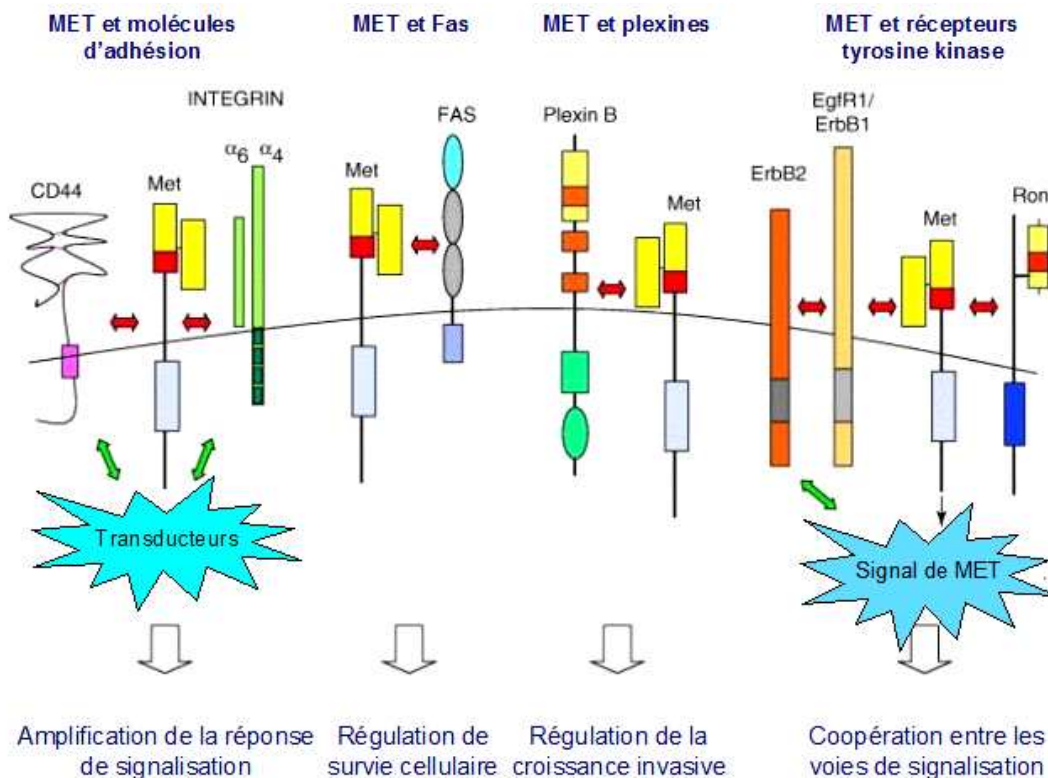
Les intégrines sont des récepteurs membranaires qui se lient aux composants de la matrice extracellulaire permettant l'adhésion cellulaire, organisent le cytosquelette et activent des voies intracellulaires. L'HGF/SF induit l'expression de l'intégrine  $\alpha2\beta1$  lorsque les cellules sont cultivées sur une matrice de collagène [119]. En fait, l'activation soutenue de ERK induite par l'HGF/SF coïncide avec son accumulation persistente dans le noyau, ce qui résulte en l'expression de différents gènes tels que les intégrines  $\alpha2$ ,  $\alpha3$  et la MMP9 [120, 121]. Les inductions de l'expression de l'intégrine  $\alpha2\beta1$  et de la MMP9 sont requises pour la dispersion induite par l'HGF/SF [120]. De plus, les intégrines  $\alpha2\beta1$  et  $\alpha3\beta1$  sont importantes pour la tubulogénèse de branchement induite par l'HGF/SF en gel de collagène tridimensionnel [122, 123].

### **4. Protéines pro- ou anti-apoptotiques**

Dans plusieurs études, les réponses de survie induites par l'HGF/SF ont été corrélées avec une augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Bcl-2, ce qui inhibe l'apoptose dépendant des mitochondries [49, 124-126]. De plus, l'HGF/SF induit l'expression des facteurs anti-apoptotiques TRAF2 et cIAP ou de l'inhibiteur de p53 MDM2, impliqués dans la réponse de survie induite par l'HGF/SF [127, 128]. Trois autres gènes cibles de l'HGF/SF impliqués dans la survie et l'apoptose ont été identifiés au laboratoire dans les cellules MCF10A : A20, daxx et smac. A20 est anti-apoptotique, smac est pro-apoptotique, tandis que daxx peut être pro- ou anti-apoptotique selon les études. De manière intéressante, l'effet de l'HGF/SF sur ces gènes corrèle avec son effet de survie dans les cellules MCF10A [129]. En effet, l'HGF/SF induit l'expression d'un gène anti-apoptotique (A20) et réprime celle d'un gène pro-apoptotique (smac), ce qui pourrait contribuer à sa réponse de survie.

#### ***D. MET dialogue pour de meilleures réponses***

Pour induire ses réponses biologiques, l'HGF/SF et MET participent à de plus larges réseaux de signalisation. En effet, outre l'activation de protéines intracellulaires de signalisation, MET est capable d'interagir avec d'autres protéines membranaires pour permettre une meilleure propagation des signaux (Figure 9) [130].



**Figure 9 : Réseaux d'interactions membranaires de MET.**

Tiré de Corso et al., 2005 [130]

### 1. Des molécules d'adhésion pour une amplification de signal

Le dialogue entre la signalisation de l'HGF/SF et les intégrines peut avoir lieu selon trois modes. Premièrement, comme nous l'avons vu précédemment, la signalisation de l'HGF/SF conduit à la modulation de l'expression même des intégrines. Deuxièmement, les voies de signalisation de l'HGF/SF et des intégrines convergent au niveau de molécules intracellulaires communes telles que FAK et Src pour transmettre le signal. Troisièmement, le récepteur MET s'associe physiquement avec les intégrines au niveau de la membrane plasmique où ils se régulent mutuellement. En effet, l'activation de MET par l'HGF/SF résulte dans la phosphorylation de l'intégrine  $\beta 4$  ce qui conduit à la stimulation des voies Ras-ERK et PI3K [131, 132]. L'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  permet donc d'amplifier la signalisation de MET [133]. De plus, la collaboration fonctionnelle entre  $\beta 4$  et MET est corroborée par l'observation de leur expression concomitante dans certaines tumeurs [134]. Il est envisageable que l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$ , dans la progression tumorale, augmente le potentiel oncogénique de MET en sensibilisant les cellules pour la réponse pro-invasive et métastatique à l'HGF/SF.

Les isoformes de CD44 sont des récepteurs transmembranaires pour l'acide hyaluronique, un composant majeur de la matrice extracellulaire, et sont impliquées dans la progression tumorale et métastatique [135, 136]. Diverses études démontrent que certaines isoformes de

CD44 promeuvent ou augmentent l'activation de MET. En effet, une isoforme de CD44 (le variant CD44v3) est capable de lier l'HGF/SF, de promouvoir la phosphorylation de MET induite par l'HGF/SF et de phosphoryler et activer des protéines de signalisation telles que les MAPK ERK [137]. Cette amplification de la signalisation de MET par CD44 nécessite la présence d'héparanes sulfates qui agiraient probablement en concentrant le ligand à la surface cellulaire et le présentant alors en oligomère, permettant des plus hauts niveaux d'activation de MET [137]. De plus, une autre isoforme de CD44 (le variant CD44v6) contribue à la signalisation de MET *via* deux mécanismes : son domaine extracellulaire est requis pour organiser un complexe ternaire entre MET, l'HGF/SF et CD44, un prérequis pour l'activation de MET ; sa queue cytoplasmique rassemble des partenaires protéiques nécessaires pour le transfert du signal vers les MAPK MEK et ERK [138]. Ainsi, ces isoformes de CD44 agiraient comme des co-récepteurs pour l'HGF/SF.

## **2. Une séquestration de Fas par MET pour réguler la survie**

Il a été montré que MET interagit avec le récepteur de mort Fas [139]. En fait, le domaine extracellulaire de MET s'associe avec Fas, ce qui empêche l'interaction de Fas avec son ligand ou son oligomérisation. La conséquence fonctionnelle de cette interaction est une résistance des cellules à la mort cellulaire médiée par Fas. Au contraire, une forte stimulation à l'HGF/SF est capable de libérer Fas de son interaction avec MET, ce qui sensibilise les cellules à l'apoptose médiée par FasL [139, 140]. Les auteurs ont même proposé que la réponse pro-apoptotique de l'HGF/SF dans certaines lignées cellulaires pourrait être la conséquence de la dissociation de Fas–MET dépendant de la concentration de l'HGF/SF et de l'expression du FasL. La pertinence biologique a été testée dans des souris transgéniques exprimant le domaine extracellulaire de MET dans le foie. Ces souris présentent une résistance à l'apoptose hépatique dépendant de Fas ou consécutive à une blessure du foie, conséquence de la séquestration de Fas par le domaine extracellulaire de MET. Cette même interaction Fas/MET a été retrouvée dans des cellules endothéliales HUVEC dans lesquelles elle permettrait aux cellules de résister à l'apoptose [141]. Ces études établissent un nouveau modèle dans lequel les récepteurs de facteurs de croissance pourraient séquestrer les récepteurs de mort pour les protéger de l'apoptose.

## **3. Les plexines/sémaphorines pour réguler la croissance invasive**

MET peut s'associer avec les trois membres de la classe B des plexines [142]. Les plexines sont des récepteurs transmembranaires pour les sémaphorines, elles aussi membranaires. Leur association est souvent impliquée dans les interactions cellulaires et régule de nombreux processus comme la guidance des axones, la croissance des vaisseaux

et la progression tumorale [143]. Outre leur lien structural, puisque possédant tous deux un domaine Sema extracellulaire, un lien fonctionnel a été établi entre MET et les plexines. En effet, il a été montré que MET peut s'associer avec la plexine B1. De plus, l'activation de la plexine B1 par son ligand sema 4D induit l'activation de MET en relais et favorise alors le programme d'invasion [142, 144, 145]. Ainsi, cette interaction pourrait permettre une fine régulation du programme d'invasion aussi bien dans des conditions physiologiques que dans des conditions de croissance tumorale [142, 146].

#### **4. Des récepteurs tyrosine kinase pour coopérer**

Le dialogue entre MET et le récepteur à l'EGF (EGFR) a lieu à différents niveaux : quand l'EGFR est surexprimé dans les cellules tumorales, il peut directement s'associer et phosphoryler MET [147]; dans des cellules de carcinome thyroïdien, l'activation de l'EGFR induit la transcription de MET [148]; dans des lignées cellulaires de carcinome pancréatique ou du foie, l'EGFR peut agir de manière plus indirecte, *via* la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui inhibent les phosphatases et conduisent à l'activation de MET [149]. Par ailleurs, il a été montré une interaction entre MET et un membre de sa famille, le récepteur tyrosine kinase RON, qui peuvent se transautophosphoryler et coopérer dans leur signalisation intracellulaire [150]. Cette coopération entre MET et RON pourrait augmenter leur potentiel métastatique [151].

## **IV. Rôle du couple HGF/SF-MET dans le cancer**

### ***A. Dérégulations du couple HGF/SF-MET***

De manière cohérente avec ses capacités à induire la survie, la prolifération ou encore la motilité, le couple HGF/SF-MET intervient à différents stades de la progression tumorale. En effet, si en conditions physiologiques l'activation de MET est un événement transitoire dépendant de son ligand, certaines situations induisent l'activation du récepteur de manière anarchique conduisant au développement tumoral (Figure 10).



		Surexpression		Mutations activatrices		TPR-MET
		HGF	MET	Tumeur	Métastase	Tumeur
Carcinome	Bladder	+	+			
	Breast	+	+	+		
	Cervical		+			
	Cholangiocarcinoma					
	Colorectal	+	+			
	Gastric	+	+	+	+	+
	Head and Neck HNSC	+	+	+	+	
	Kidney, HPRC	+	+	+		
	Kidney, PRC	+	+	+		
	Liver, childhood HCC	+	+	+		
	Lung, SCLC	+	+	+		
	Nasopharyngeal	+	+			
	Oesophageal		+			
	Oropharynx	+	+		+	
	Ovarian		+	+		
Pancreas	+	+	+			
Prostate	+	+				
Thyroid	+	+				
Sarcome	Musculoskeletal sarcoma	+	+			
	Osteosarcoma	+	+			
	Synovial Sarcoma	+	+			
	Rhabdomyosarcoma		+			
	MFH/ fibrosarcoma	+	+			
	Leiomyosarcoma	+	+			
Kaposi's sarcoma	+	+				
Hématopoïétique	Multiple myelomas	+	+			
	Lymphoma	+	+			
	Adult T cell leukemia		+			
	Chronic Myeloid Leukemia	+				
autres	Glioma/ Astrocytoma	+	+	+		
	Melanoma	+	+			
	Mesothelioma	+	+			
	Wilm's tumor	+	+			

**Figure 10 : Tableau des cancers impliquant le couple de l'HGF/SF-MET.**

Dans de nombreuses tumeurs ou métastases, la surexpression de MET et/ou de l'HGF/SF, des mutations activatrices du récepteur ou l'expression de TPR-MET ont pu être révélées (Tiré de Birchmeier et al., 2003 [11]).

### 1. Réarrangement chromosomique

MET a été découvert sous la forme oncogénique TPR-MET. Cette protéine de fusion comprend le domaine de dimérisation de TPR et le domaine kinase de MET. Elle est donc constitutivement dimérisée, ce qui permet la transautophosphorylation et l'activation catalytique de MET [4]. Le potentiel oncogénique de TPR-MET a été évalué notamment par la formation de foyers transformés à partir de fibroblastes et dans des souris transgéniques, où il conduit au développement de tumeurs [152]. Cette protéine a été détectée dans des échantillons de biopsie dérivés de tumeurs gastriques [153]. Cependant, ces résultats restent controversés puisqu'une autre étude utilisant les mêmes techniques montre que TPR-MET n'est pas exprimé dans ce même type de tumeur [154].

## 2. Surexpression de MET et/ou de l'HGF/SF

En cas de surexpression du récepteur MET et de son ligand, l'activation peut avoir lieu soit d'une manière paracrine soit autocrine. L'activation paracrine, typique des conditions physiologiques, peut en effet devenir pathologique en cas de production anormale d'HGF/SF par les cellules mésenchymateuses (Figure 10). Par exemple, le niveau élevé d'HGF/SF dans les tumeurs ou le plasma sanguin a été observé dans un grand nombre de cancers. L'activation autocrine a lieu quand les cellules tumorales expriment de manière aberrante à la fois l'HGF/SF et son récepteur, comme il est observé dans des ostéosarcomes et des rhabdomyosarcomes, des gliomes et carcinomes de la thyroïde, du sein et des poumons [11, 155]. Ces observations faites chez l'Homme ont été appuyées par différentes expériences. Par exemple, des lignées cellulaires humaines et murines surexprimant de manière ectopique l'HGF/SF et/ou MET deviennent tumorigéniques et métastatiques dans des souris nude [156]. De plus, des modèles murins exprimant MET ou son ligand en transgène développent différents types de tumeurs et lésions métastatiques [157]. Parallèlement, la diminution de l'expression de MET ou de l'HGF/SF dans des cellules tumorales humaines baisse leur potentiel tumorigène [158].

Un autre type d'altération est la surexpression de récepteurs localisés à la surface de la membrane qui subissent alors une dimérisation spontanée et donc une activation, même en absence de ligand (Figure 10) [159]. Une augmentation de l'expression de MET peut être due à : une amplification génique de MET, comme dans les tumeurs colorectales [11]; une augmentation de la transcription de MET induite par d'autres oncogènes tels que RAS, RET et ETS [11, 160, 161] ou par hypoxie [162].

## 3. Mutations de MET

Des mutations ont été identifiées dans le gène *c-met* dans des carcinomes papillaires rénaux héréditaires, apportant une preuve directe de l'implication de MET dans le cancer (Figure 10) [163]. Des mutations du même type ont également été observées dans plusieurs types de carcinomes sporadiques. La plupart de ces mutations sont situées dans le domaine kinase et augmentent l'activité tyrosine kinase du récepteur [155]. De manière intéressante, des mutations activatrices ont été décrites spécifiquement dans les métastases pulmonaires et des ganglions lymphatiques, ce qui souligne l'implication probable de MET durant la progression métastatique [164, 165]. Des études *in vitro* ont montré que les mutations de MET identifiées dans les cancers induisent une augmentation de l'activité kinase du récepteur, mais que celui-ci est toujours dépendant de son ligand pour une activation complète [166]. En fait, on observe une diminution du seuil d'activation plus qu'une activation constitutive [167]. De plus, dans des biopsies de tumeurs pulmonaires, des mutations du

récepteur MET gain-de-fonction ont été identifiées au niveau du domaine juxtamembranaire [168]. Des travaux récents réalisés par knock-in dans des souris ont permis de montrer que chaque mutation a une tumorigénicité propre [169, 170]. En effet, chaque mutation affecte différemment le récepteur et la signalisation conduisant à des profils de tumeurs différents.

## **B. Thérapies**

Le couple HGF/SF-MET est impliqué, nous l'avons vu, dans différentes étapes de la progression tumorale par le fait de diverses dérégulations, résultant dans des réponses biologiques inadéquates. Ainsi, des thérapies anti-cancéreuses ont été développées en prenant pour cible la signalisation de MET et de l'HGF/SF (Figure 11) [130].

### **1. Cibler l'HGF/SF**

Les premiers essais visant le couple HGF/SF-MET pour empêcher la progression tumorale commencèrent dans la fin des années 90. Leur but était d'empêcher la fixation de l'HGF/SF sur son récepteur en utilisant des antagonistes de l'HGF/SF. Le plus caractérisé des compétiteurs de l'HGF/SF est NK4, une molécule composée de la boucle N-terminale et des 4 domaines kringle de l'HGF/SF. NK4 se fixe à MET sans en induire l'activation et se comporte ainsi comme un compétiteur. Le potentiel thérapeutique de NK4 a été testé avec succès dans différents modèles de tumeurs murines [171, 172]. Des anticorps monoclonaux murins dirigés contre l'HGF/SF humain sont des anti-tumoraux efficaces dans des modèles animaux, à condition d'utiliser au moins 3 anticorps, chacun contre un épitope différent de l'HGF/SF, pour complètement inhiber l'activation de MET [173, 174]. Récemment, un anticorps monoclonal humain neutralisant de l'HGF/SF a été développé. Il possède des propriétés anti-tumorales et son introduction en essai clinique de phase 1 est une importante avancée dans cette stratégie [175]. Il a récemment été montré qu'une forme de pro-HGF/SF, obtenue par mutation d'un acide aminé qui empêche le clivage du précurseur simple chaîne en forme mature hétérodimérique, peut à la fois déplacer le ligand du récepteur et inhiber de manière compétitive l'activation protéolytique du pro-HGF/SF endogène. L'expression locale et systémique de cette molécule *via* une technologie lentivirale interfère avec la croissance tumorale, l'angiogenèse et la métastase dans les souris, sans altérer les paramètres physiologiques vitaux [176].

### **2. Cibler MET**

#### a) *Inhibition de son activité kinase*

L'inhibition de l'activité kinase de MET a été envisagée par l'utilisation de petits compétiteurs de l'ATP [177-180]. L'efficacité de ces molécules a été déjà démontrée pour d'autres récepteurs. Cependant, un de leurs problèmes majeurs est leur sélectivité. Les premiers travaux ont montré que le K252A, un alcaloïde dérivé de la staurosporine, peut inhiber l'autophosphorylation de MET, son activité mitogène, l'activation de Akt et réverter le potentiel transformant de TPR-MET [177]. Néanmoins, cet inhibiteur possède une faible spécificité. Des inhibiteurs plus sélectifs de la fixation de l'ATP à MET ont ensuite été développés. Parmi ces composants, 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 et diminuent la tumorigénicité dans des modèles animaux [177, 179, 181]. De manière intéressante, la sensibilité du SU11274 sur des cellules exprimant un récepteur MET muté est différente selon la mutation considérée. De plus, les cancers gastriques avec une amplification du gène de MET ont une sensibilité plus grande pour le PHA665752 [180, 182]. Ces observations suggèrent que les différents inhibiteurs pourraient être utilisés spécifiquement selon le cancer étudié.

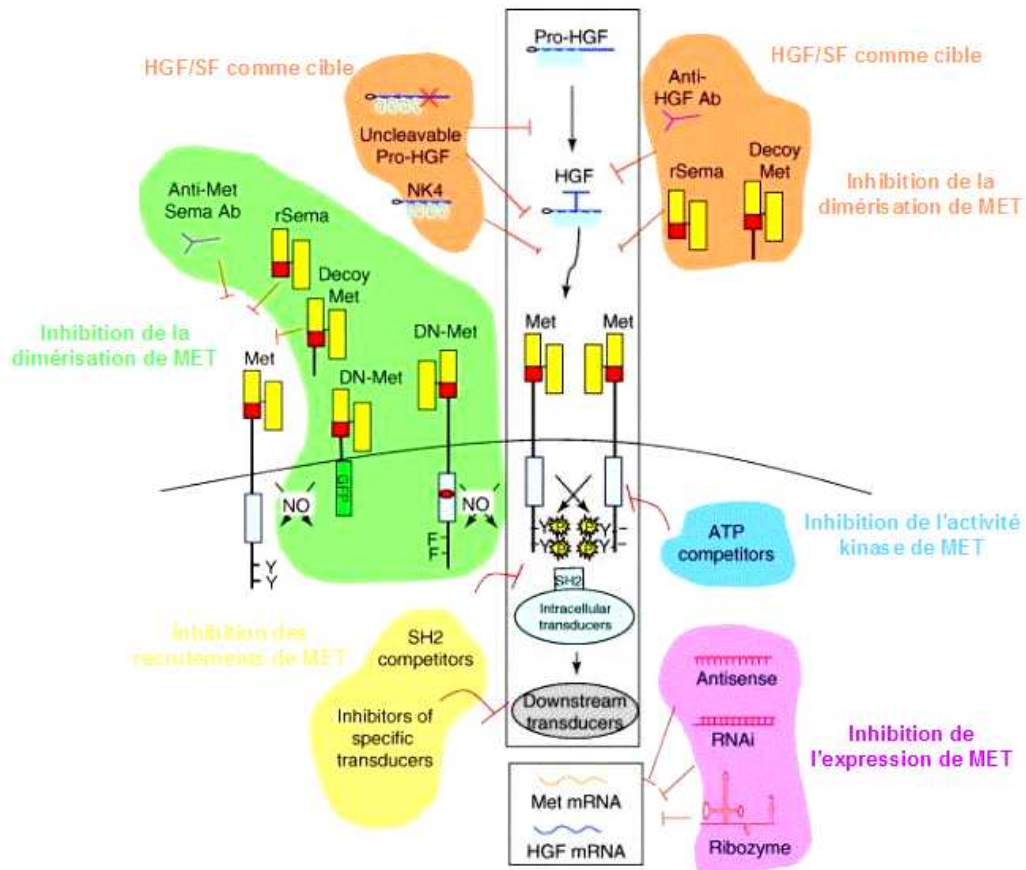
#### b) *Inhibition de son expression*

Une autre stratégie anti-cancéreuse vise la diminution de l'expression de l'HGF/SF et/ou MET. Celle-ci a été envisagée selon plusieurs approches telles que l'utilisation d'oligonucléotides antisens ou de ribozymes délivrés par des liposomes [158, 183, 184] ou encore la technique d'interférence à l'ARN (RNAi) [185]. L'utilisation d'ARN interférence a déjà permis de supprimer l'expression de MET dans les modèles de tumorigénèse chez la souris [185].

#### c) *Inhibition de sa dimérisation*

Une autre stratégie consiste à empêcher sa dimérisation. Différents dominants négatifs de MET ont été générés soit par délétion de son domaine kinase et des résidus tyrosines de la queue C-terminale soit par remplacement de son domaine intracellulaire par la GFP [144, 186, 187]. Ces dominants négatifs se dimérisent avec des récepteurs sauvages mais en empêchent l'activation. L'expression ectopique de ces mutants réduit l'activation de MET *in vitro* et diminue la croissance tumorale et la métastase dans des modèles murins de xénogreffe [186]. Cependant, leur libération à l'intérieur d'une tumeur d'un patient ne semble pas aisée. Enfin, le ciblage de son domaine extracellulaire, grâce à l'utilisation d'anticorps antagonistes, de domaines solubles Sema recombinants [24] ou des formes solubles de la

partie extracellulaire de MET (decoy) [188], a permis d'empêcher à la fois sa dimérisation et la liaison de son ligand.



**Figure 11 : Stratégies des thérapies visant MET et l'HGF/SF.**  
Tiré de Corso et al., 2005 [130]

*Ainsi, nous l'avons vu, le facteur de croissance HGF/SF et son récepteur tyrosine kinase MET sont à l'origine de nombreuses réponses biologiques telles que la prolifération, la dispersion, la morphogenèse ou encore la survie. L'étendue des fonctions remplies par ce couple lui confert un rôle important lors du développement et de la progression tumorale. Ces réponses passent avant tout par une bonne gestion des différentes voies de signalisation que peut initier MET. En effet, MET active des cascades de protéines intracellulaires et dialogue avec certaines protéines membranaires, induit aussi l'expression de nouvelles protéines pouvant participer à de nouvelles voies de signalisation ; ce réseau de signalisation permet une bonne intégration du signal pour permettre la meilleure réponse possible.*

*Ainsi, les cascades de signalisation initiées par MET pleine longueur activé par son ligand sont largement étudiées. Cependant, la forme pleine longueur de MET n'est pas la seule qui existe. En effet, différents fragments de MET, issus de sa protéolyse, ont déjà été observés tels que des fragments extracellulaires solubles ou des fragments intracellulaires comprenant le domaine kinase de MET [70, 189, 190]. Pour autant, les mécanismes générant ces fragments n'ont pas été décrits et leurs conséquences fonctionnelles peu étudiées. Pourtant, comme nous allons le voir dans la seconde partie de l'introduction, la protéolyse et la génération de fragments à partir d'une protéine peuvent avoir des fonctions importantes et originales par rapport à la fonction de la protéine pleine longueur.*

*Initialement, la protéolyse était uniquement associée à la dégradation de protéines non fonctionnelles mais au fil du temps, de nouvelles fonctions ont été attribuées à ce processus. De nombreuses protéases sont impliquées dans ces clivages mais nous allons porter notre attention sur trois catégories de protéases : les caspases, qui clivent leurs substrats en intracellulaire et durant l'apoptose ; les métalloprotéases qui clivent des protéines transmembranaires dans la partie extracellulaire ; et la  $\gamma$ -secrétase qui clive ses substrats dans un domaine intramembranaire. Malgré leurs différences apparentes, ces clivages possèdent un point commun : ils modifient la fonction initiale du substrat en créant des fragments possédant des activités spécifiques. Ainsi, la protéolyse peut avoir de multiples conséquences cellulaires selon le substrat concerné.*

## Deuxième partie : La protéolyse, un mode d'action

### **I. Clivages par les caspases**

#### ***A. L'apoptose, une mort cellulaire programmée***

##### **1. Caractéristiques de l'apoptose**

La mort cellulaire est un processus qui peut être contrôlé ou non par les propres constituants de la cellule. En l'absence de régulation, on définit la mort cellulaire comme nécrotique alors qu'en présence de régulation, on la qualifie de mort cellulaire programmée. En 1973, Schweichel et Merker ont défini deux types de mort cellulaire programmée : l'apoptose (débris cellulaires éliminés par les lysosomes des cellules phagocytaires) et l'autophagie (nécessité des lysosomes des cellules mourantes) [191].

L'apoptose joue un rôle clé dans un grand nombre de processus biologiques tels que l'homéostasie cellulaire et le développement embryonnaire en éliminant les cellules qui pourraient nuire à l'organisme [192]. Elle intervient durant certaines étapes du développement mais également suite à des stress extérieurs comme l'exposition à des toxines, des radiations, des infections virales ou la privation en facteurs de croissance [193]. La perturbation des voies de signalisation contrôlant l'induction, l'exécution ou la prévention de l'apoptose peut être à l'origine de nombreuses pathologies. Certaines sont liées à une inhibition de l'apoptose (cancers, syndromes lymphoprolifératifs) alors que d'autres sont associées à une stimulation de ce phénomène (maladies neurodégénératives, maladies autoimmunes, SIDA) [194-196].

Les critères morphologiques de l'apoptose ont été décrits en 1972 [193]. La cellule vouée à mourir s'isole en perdant ses contacts avec les cellules environnantes (Figure 12). L'un des premiers changements de sa morphologie est une condensation générale du noyau et du cytoplasme qui induit une diminution significative du volume cellulaire. Au sein du noyau, la chromatine, elle aussi, se condense et est clivée en fragments réguliers d'environ 180 paires de bases. Le cytoplasme se remplit alors de vacuoles et la membrane plasmique se met à bourgeonner : il y a formation de corps apoptotiques [193, 197, 198]. Par ailleurs, la translocation de la phosphatidylsérine (un phospholipide chargé négativement à pH neutre) du feuillet interne de leur membrane vers le feuillet externe va permettre la reconnaissance et l'élimination des corps apoptotiques par les phagocytes.

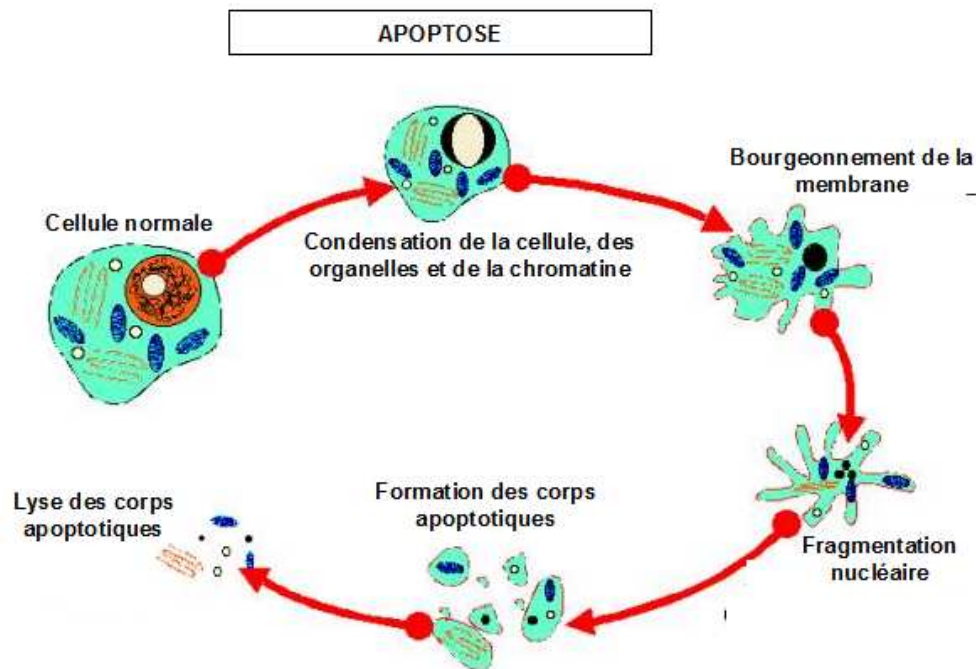


Figure 12 : Déroulement de l'apoptose en plusieurs étapes.

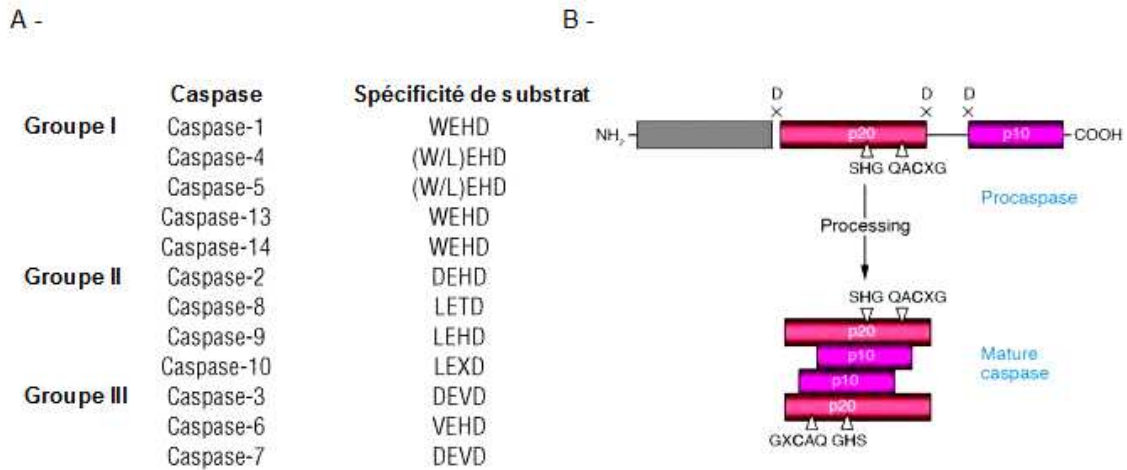
## 2. Cascades de caspases

L'apoptose est un phénomène rapide se déroulant en quelques heures, déclenché par un événement local à l'échelle de la cellule. Pour aboutir rapidement à des effets aussi massifs, l'apoptose est induite par un phénomène de cascade qui va amplifier la réponse de la cellule à partir du stimulus initial [199]. La plupart des changements cellulaires décrits précédemment sont causés par un ensemble de protéases, les caspases (cystein aspartyl-specific proteases), qui sont activées de façon spécifique dans les cellules. Ce sont elles qui constituent, en règle générale, les protéines initiatrices et effectrices de la cascade apoptotique. Les caspases représentent une famille de protéases à cystéine, reconnaissant un motif composé de 4 acides aminés de leur substrat (Figure 13A). Le clivage par la caspase a lieu après l'acide aspartique C-terminal de ce motif. La spécificité du clivage est déterminée par les trois résidus immédiatement situés du côté aminoterminal de l'acide aspartique. Selon leur structure et leurs substrats, les caspases ont été divisées en trois groupes : inflammatoires (I), initiatrices (II) et effectrices (III).

Les caspases sont d'abord synthétisées sous forme inactive composée de deux sous-unités séparées et la conversion en enzyme fonctionnelle nécessite deux clivages séquentiels (Figure 13B) [200-202]. Leur activation est régulée et peut avoir lieu par trois mécanismes: activation après clivage par une autre caspase, activation induite par rapprochement de caspases ayant une faible activité basale, lors de la multimérisation d'un récepteur de mort (caspase initiatrice) ou association avec une sous-unité régulatrice (APAF1 + cytochrome c). En résumé, il apparaît que les caspases effectrices sont généralement activées par



protéolyse par une caspase en amont alors que les caspases initiatrices sont activées par des interactions entre protéines.

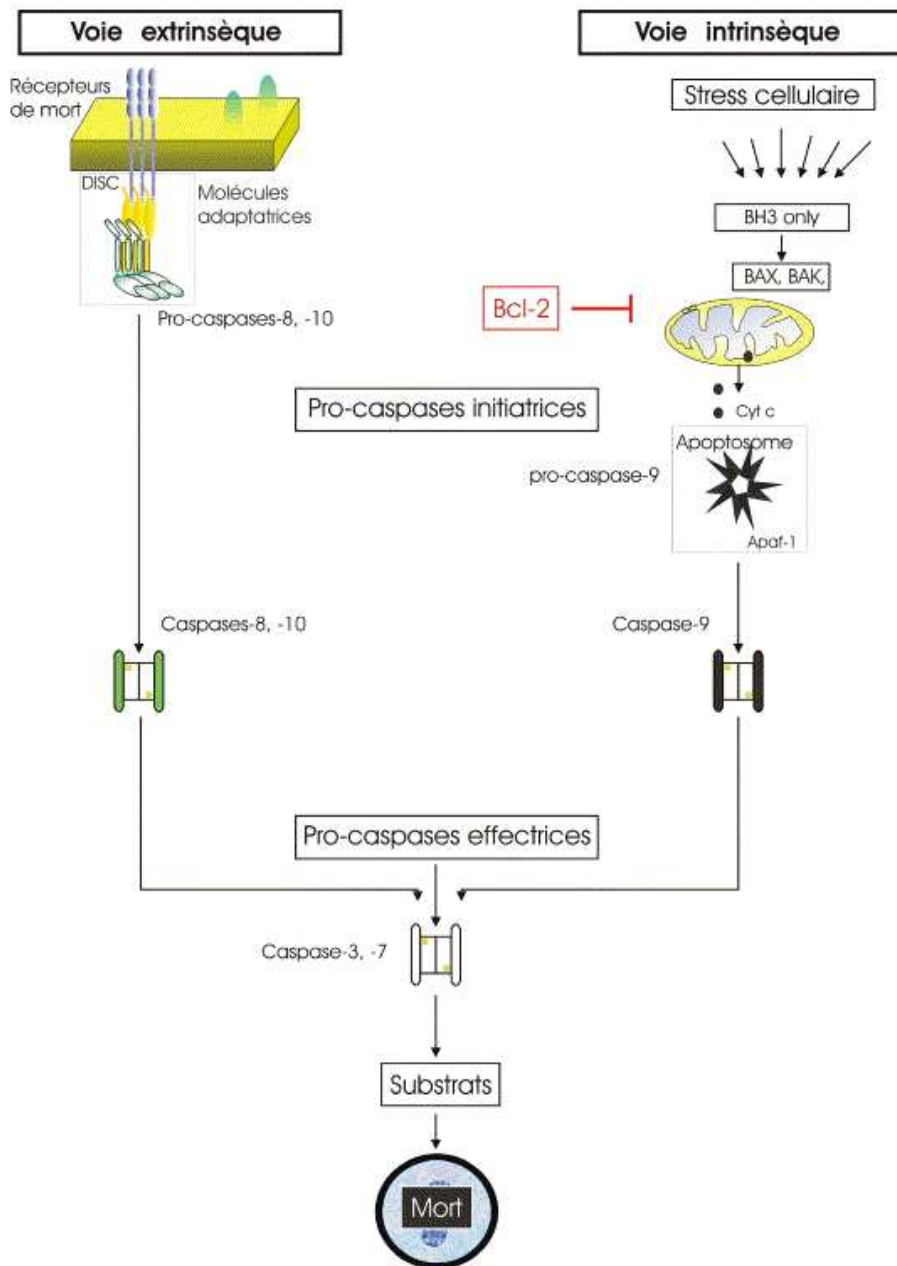


**Figure 13 : Les caspases.**

A – Les trois groupes de caspases. B - Maturation des caspases (Tiré de Lavrik et al., 2005 [201]).

### 3. Voies extrinsèque et intrinsèque

Deux voies indépendantes d'initiation de la mort cellulaire et d'activation des caspases existent : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Figure 14). La voie extrinsèque est principalement induite par l'activation de récepteurs de mort, tels que TRAIL ou Fas, qui mène à l'activation des caspases 8 et 10. L'activation de la voie intrinsèque a lieu, quant à elle, en réponse à des stress tels que des dommages à l'ADN, des anomalies du cycle cellulaire ou une privation en facteurs de croissance. Cette voie implique l'activation des protéines de la famille Bcl-2, pro- et anti-apoptotiques, qui régulent l'apoptose en contrôlant la perméabilité de la mitochondrie et notamment le relargage du cytochrome c. Un complexe nommé apoptosome se forme entre le cytochrome c libéré, la protéine adaptatrice APAF1 et la caspase 9. Ces deux voies convergent au niveau de l'activation de caspases effectrices, notamment la caspase 3, responsables de l'exécution du programme apoptotique. Même si l'on peut distinguer la voie intrinsèque de la voie extrinsèque, ces deux voies sont connectées puisque la caspase 8 est capable de cliver et d'activer un intermédiaire qui favorise le relargage mitochondrial et l'activation de la voie intrinsèque [203, 204].



**Figure 14 : Voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque.**  
Tiré de Marchetti et al., 2005 [204]

### ***B. Cibles des caspases, protéases clés de l'apoptose***

A ce jour, plus de 280 substrats des caspases ont été identifiés, des protéines aux structures et fonctions très diverses [205]. L'activité de tous ces substrats est modifiée par clivage par les caspases afin de garantir le bon déroulement de l'apoptose. A travers quelques exemples choisis, nous verrons que le clivage par les caspases peut soit inhiber, soit activer, soit réorienter la fonction de la protéine cible.

## **1. Inactivation par clivage (Perte de fonction)**

De nombreuses protéines sont impliquées dans des processus anti-apoptotiques pour protéger les cellules de la mort cellulaire. Mais les cellules ont élaboré des mécanismes pour interrompre l'efficacité de la signalisation anti-apoptotique afin de permettre l'exécution du processus apoptotique [205].

Par exemple, les signaux de survie initiés par Raf1, *via* la voie MAPkinase ERK, et Akt, *via* la phosphorylation de Bad, protègent contre l'apoptose. Il a été montré que Raf1 et Akt sont des substrats de la caspase 3 durant l'apoptose et que cette dégradation corrèle avec la perte de leur activité [206]. Ainsi, leur dégradation contribue probablement à une boucle de régulation positive de l'apoptose.

De même, NFκB, impliqué dans la survie est une cible des caspases. NFκB est un facteur de transcription hétérodimérique qui est sequestré dans le cytoplasme par des protéines de la famille IκB [207, 208]. La phosphorylation de IκB permet son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. La dégradation de IκB libère NFκB qui est transloqué dans le noyau et active des gènes cibles notamment anti-apoptotiques [209-213]. La voie NFκB est un exemple typique d'une complète perte de fonction anti-apoptotique par clivages caspases: (1) le clivage de la sous-unité p65 (RelA) génère un fragment qui est capable de se lier à l'ADN mais qui a perdu son activité transcriptionnelle, et donc fonctionne comme un dominant négatif [214]; (2) l'inhibiteur de NFκB, IκB, est normalement dégradé par le protéasome. Le clivage N-terminal de IκB par les caspases génère un super-répresseur constitutif qui n'est plus dégradé par le protéasome [215]; (3) le clivage de la protéine adaptatrice TRAF-1 contribue à l'inhibition de l'activation de NFκB et de sa capacité anti-apoptotique [216].

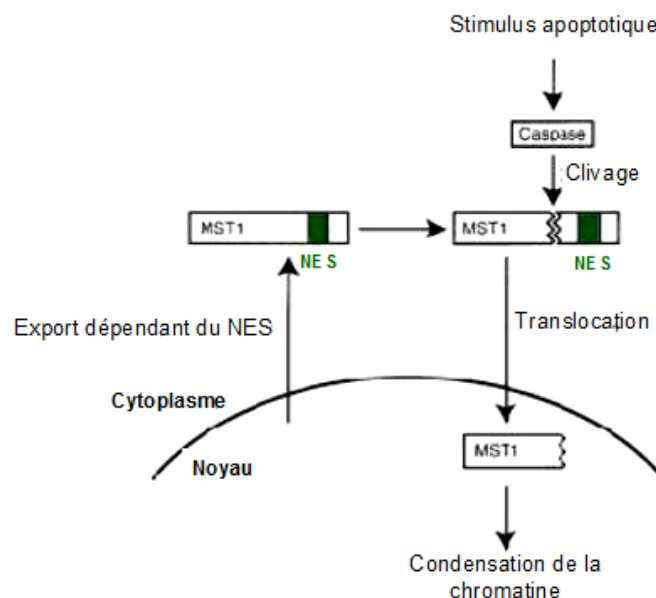
Ainsi, le clivage caspase peut permettre d'inactiver les fonctions de protéines qui seraient capables de contrecarrer l'apoptose.

## **2. Activation par clivage (Gain de fonction)**

De nombreuses kinases sont des cibles des caspases durant l'apoptose et sont activées par ces clivages ce qui conduit, encore une fois, à une modulation de leur activité [217]. Dans ce cas, il s'agit souvent de protéines pouvant avoir une fonction bien particulière durant l'apoptose.

On peut citer l'exemple de ROCK1, une sérine/thréonine kinase régulée par Rho-GTP, qui contribue au maintien du système actine-myosine. Il a été montré que durant l'apoptose, le clivage de ROCK1 par la caspase 3 conduit à la perte d'un domaine d'autoinhibition et à une activité kinase dérégulée et constitutive [218-220]. La phosphorylation des substrats, tels que

les chaînes légères de la myosine, par ROCK1 clivé, est suffisante et nécessaire pour le bourgeonnement de la membrane et la formation de corps apoptotiques, caractéristiques morphologiques de l'apoptose. La sérine-thréonine kinase Mst1 est clivée et activée par les caspases en réponse à un stimulus apoptotique [221]. Cette protéine induit l'activation des caspases, des changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose et active les voies JNK et p38. Mst1 pourrait donc permettre l'amplification de l'apoptose. Le clivage par la caspase 3 génère un fragment N-terminal actif par deux actions : il retire un domaine autoinhibiteur du domaine catalytique de Mst1, situé en C-terminal, augmentant alors l'activité kinase du fragment N-terminal de la protéine [221, 222]. De plus, ce clivage retire 2 signaux d'export nucléaire (NES) fonctionnels ce qui permet à Mst1 de transloquer dans le noyau et de promouvoir la condensation de la chromatine (Figure 15) [223].



**Figure 15 : Modèle du rôle de la translocation de Mst1 dans l'apoptose.**  
Tiré de Ura et al., 2001 [223]

Les caspases, en clivant leurs substrats, peuvent activer des protéines, notamment des kinases, pouvant jouer un rôle dans l'apoptose. Cette activation résulte soit d'une activation de l'activité kinase de la protéine soit d'une translocation de la protéine tronquée dans un autre compartiment cellulaire où elle pourra agir [224].

### 3. Réorientation fonctionnelle par clivage : Les récepteurs à dépendance

Nous l'avons vu, les caspases peuvent cliver des protéines anti-apoptotiques afin de les mettre hors-jeu lors de l'apoptose. Mais les caspases peuvent également cliver certains

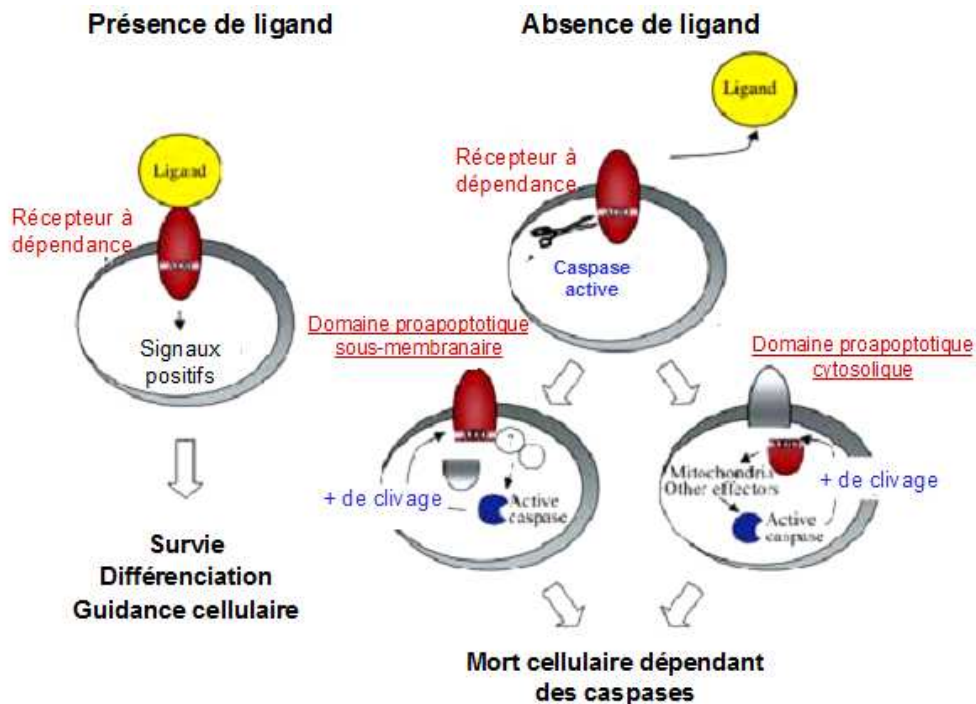
substrats, des récepteurs plus exactement, impliqués dans la survie cellulaire pour les transformer en molécules pro-apoptotiques. Ces substrats forment la famille des récepteurs à dépendance dont le point commun est cette réorientation de leurs fonctions médiée par les caspases [225, 226]. La liste de ces récepteurs à dépendance est régulièrement complétée par la découverte de nouveaux récepteurs portant ces mêmes caractéristiques (Figure 16).

Récepteurs à dépendance	Fonction physiologique	Domaine de mort / ADD	Site de clivage
$\alpha\beta_3$	Intégrines récepteurs hétérodimériques pour la matrice extracellulaire	Séquence dans le domaine juxtamembranaire : KLLITIHDRKEF	Inconnu
ALK	Récepteur tyrosine kinase Anaplastic Lymphoma Kinase	Situé entre les AA 1090-1125	Asp 1160
AR	Récepteur aux androgènes cytosolique/nucléaire	AA au site polyglutamine	Asp 146
DCC	Gène suppresseur de tumeur Deleted in Colorectal Cancer	AA 1243-1264	Asp 1290
p75 <sup>NTR</sup>	Récepteur du NGF (Nerve Growth Factor)	ADD C-terminal	Protéase inconnue
Patched (Ptc)	Son ligand est sonic hedgehog	Dans le septième domaine intracellulaire	Asp 1392
RET	Rearranged during transfection	Situé entre les Asp707-1017	VSVD (707) DYLD (1017)
Unc5H2	Gène suppresseur de tumeur Uncoordinated gene 5	Domaine de mort C-terminal	Asp 412

**Figure 16 : Liste des récepteurs à dépendance.**  
Tiré de Graf et al., 2007 [227]

#### a) Le concept

En présence de leur ligand respectif, les récepteurs à dépendance médient un signal mitogénique, prolifératif ou anti-apoptotique. Par contre, en absence de leur ligand, ils sont souvent sujets au clivage par les caspases [225, 228, 229]. Ce clivage permet soit le relargage d'un fragment pro-apoptotique soit l'exposition d'un domaine de mort, rendant alors le récepteur clivé capable de promouvoir la mort cellulaire. Les fragments générés participent donc à l'amplification de la mort cellulaire (Figure 17). Ainsi, ce type de récepteur crée un état de dépendance de la cellule envers son ligand, en favorisant l'apoptose lorsque celui-ci est absent. Avec l'exemple représentatif de DCC, nous verrons le fonctionnement et les implications physiologiques et pathologiques des récepteurs à dépendance.



**Figure 17 : Mécanismes de fonctionnement des récepteurs à dépendance.**  
Tiré de Mehlen et Thibert, 2004 [226]

*b) DCC, un digne représentant des récepteurs à dépendance*

DCC est un récepteur transmembranaire de 190 kDa, connu pour son implication dans les interactions cellule-cellule ou matrice-cellule [230, 231] dont le ligand est la nétrine 1 [232]. Il semble qu'en absence de ligand, le clivage de DCC par les caspases est une étape initiale qui résulte dans l'exposition d'un domaine pro-apoptotique, dit domaine d'addiction/dépendance (ADD) activant lui-même les caspases, amplifiant alors le processus apoptotique. Il a été montré que l'activation des caspases et de l'apoptose induite par DCC est différente des voies classiques d'apoptose extrinsèque et intrinsèque [233]. De plus, différents interacteurs de DCC importants pour sa fonction pro-apoptotique, dont les caspases 3 et 9 et DCC-interacting protein 13 $\alpha$  (DIP13  $\alpha$ ), ont été découverts sans que les mécanismes par lesquels DCC induit l'apoptose ne soient connus [233, 234].

DCC est impliqué dans la guidance axonale et la survie durant le développement neuronal. En présence de nétrine 1, DCC induit un signal de prolifération et de survie, ce qui conduit à la croissance neuronale [232, 235, 236]. Mais en absence de nétrine 1, DCC transmet des effets apoptotiques [234, 237]. Ainsi, durant le développement du système nerveux, la présence de nétrine 1 est cruciale pour maintenir la survie des neurones exprimant DCC [237, 238].

De plus, DCC est impliqué dans la progression tumorale. En effet, DCC a été découvert comme gène suppresseur de tumeur, délété dans plus de 50% des carcinomes colorectaux mais également dans d'autres types de tumeurs telles des carcinomes gastriques,

prostatiques ou pancréatiques [230, 239, 240]. En réalité, par ses caractéristiques de récepteur à dépendance, DCC serait plutôt un suppresseur de tumeur conditionnel [241]. En effet, en absence de ligand, il est suppresseur de tumeur par ses capacités apoptotiques. Ainsi, certaines études montrent que la restauration de DCC conduit à l'inhibition de la croissance tumorale [242-244]. En revanche, cet effet peut être réversé en présence de nétrine 1, où il induira la survie cellulaire. En effet, il a été montré que l'inhibition de la mort cellulaire par une expression forcée de nétrine 1 dans le tractus gastrointestinal de souris conduit à une formation spontanée de lésions hyperplasiques et néoplasiques [241, 245].

*Si les caspases sont capables de cliver un grand nombre de substrats pour en modifier leurs fonctions, un autre type de protéolyse concerne un grand nombre de protéines transmembranaires : l'« ectodomain shedding » ou élagage du domaine extracellulaire. Une fois de plus, nous verrons que ce type de clivage a de larges conséquences fonctionnelles.*

## **II. Elagage de l'ectodomaine par des métalloprotéases**

### **A. Une guillotine membranaire**

L'« ectodomain shedding », soit littéralement l'élagage du domaine extracellulaire, est un processus dans lequel les domaines extracellulaires des protéines transmembranaires sont élagués de la surface cellulaire par une protéase [246-248]. Le clivage des protéines membranaires a lieu au niveau ou près de la surface cellulaire. De ce clivage résulte alors le relargage du domaine extracellulaire, qui peut être retrouvé en tant que fragment soluble et actif dans les milieux de cultures des cellules [249-251, 252, 253]. Ce relargage du domaine extracellulaire de protéines transmembranaires est un processus de régulation fonctionnelle. En effet, ce processus permet à la cellule de modifier rapidement le profil protéique de la surface en réponse à des changements environnementaux et de fournir des régulateurs solubles intercellulaires. Du fait de la grande diversité des protéines touchées par cet élagage, ce processus peut réguler la plupart des fonctions cellulaires médiées par les protéines transmembranaires et s'avère essentiel non seulement durant le développement mais également dans des conditions pathologiques telles que l'inflammation ou les cancers [254, 255]. En effet, il a été estimé que 2 à 4% des protéines de la surface cellulaire sont sujettes à ce type de protéolyse [249, 256], dont les facteurs de croissance ancrés à la membrane [257], certains de leurs récepteurs [258, 259, 260, 261, 262], des molécules d'adhésion [263] ou des molécules de la réponse immunitaire [257, 264].

## B. Métalloprotéases, régulateurs de l'élagage

### 1. ADAM et MMP, bourreaux des protéines transmembranaires

Les deux groupes majeurs des protéases impliquées dans l'élagage de l'ectodomaine sont les désintégrine métalloprotéases ADAM (A disintegrin and metalloproteinase) et les métalloprotéases matricielles MMP (matrix metalloproteinase).

La famille ADAM compte 33 membres, possédant tous une structure similaire de protéine transmembranaire, et sont impliqués dans des processus tels que la signalisation, l'adhérence et la protéolyse. Les protéines de la famille ADAM sont composées de six domaines (Figure 18). Le pro-domaine (Pro) maintient la protéine inactive. En effet, il bloque le site actif du domaine métalloprotéase (Meta). Le domaine métalloprotéase est de type Metzincin (métalloprotéase à Zinc) et est responsable du rôle de protéolyse de cette famille de protéases. Ainsi, la maturation des protéines de la famille ADAM nécessite l'ablation du prodomaine. Les domaines Désintégrine (Dis) et riches en cystéine (Cys) composent la région de la protéine impliquée dans l'adhérence, en interagissant, respectivement, avec les intégrines et les héparanes sulfates [265]. Le domaine transmembranaire est précédé par des répétitions de type EGF (EGF) et suivi par le domaine cytoplasmique (Cyt).

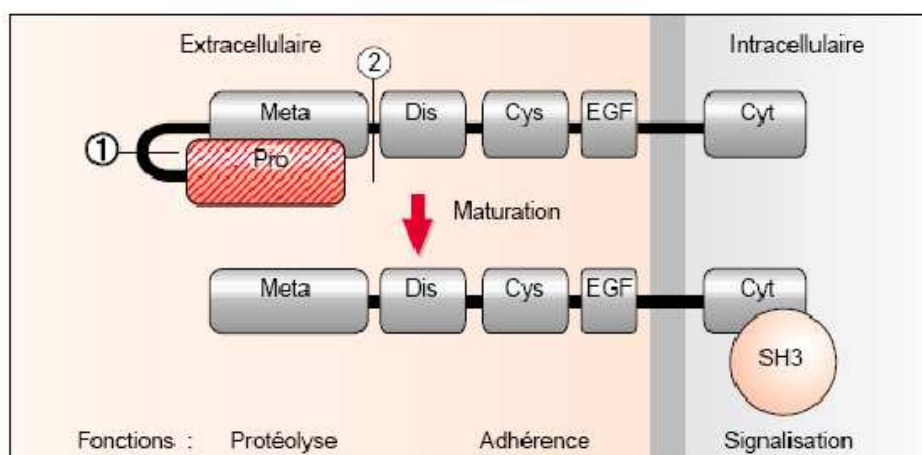


Figure 18 : Organisation classique d'une protéine ADAM.

Tiré de Alfandari et al., 1999

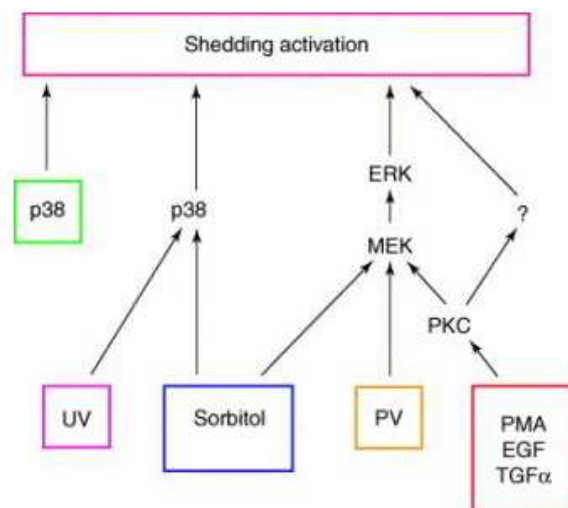
Les MMPs représentent une autre famille de protéases, incluant des membres transmembranaires et sécrétés, capables de réguler le comportement cellulaire par clivage de divers substrats [266]. Tout comme les ADAMs, les MMPs sont dépendantes du zinc et



contiennent une structure à plusieurs domaines dont un prodomaine et un domaine catalytique.

## 2. Régulation de l'élagage

L'élagage médié par les ADAM peut avoir lieu à la fois de manière constitutive et à la fois en réponse à une variété de stimuli [267, 268]. Parmi eux, nous pouvons citer les esters de phorbol, des facteurs de croissance, des stress tels que les UV ou des variations osmotiques. Etant donnée la diversité des signaux et des substrats pour l'action des ADAM, l'élagage extracellulaire est contrôlé par de multiples mécanismes de régulation [267]. Néanmoins, les voies des MAPkinases sont souvent un passage obligé entre le stimulus et le clivage (Figure 19) [256]. Les protéines p38, MEK-ERK et PKC sont toutes impliquées, chacune en réponse à un stimulus différent. Par exemple, la stimulation par des esters de phorbol (comme le PMA, pour phorbol myristate acetate) ou des facteurs de croissance (EGF, transforming growth factor  $TGF\alpha$ ) est médiée par la Protéine Kinase C (PKC) puis la voie Mek/ERK. Des stress osmotiques (sorbitol) peuvent agir sur les deux voies Mek/ERK et p38, alors que les UltraViolets n'activent que p38. L'élagage constitutif, quant à lui, ne semble dépendre que de signaux médiés par la p38.



**Figure 19 : Régulation des clivages médiés par les ADAM.**

Tiré de Huovila et al., 2005 [256]

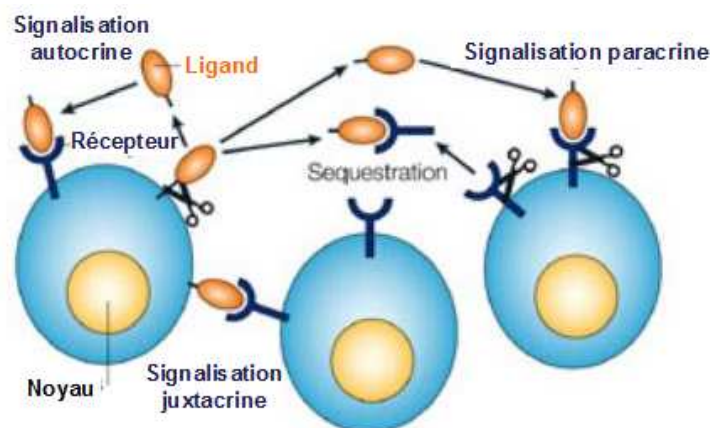
### ***C. Conséquences fonctionnelles de cette décapitation***

L'élagage extracellulaire peut toucher différentes catégories de protéines membranaires, dont les principales sont des facteurs de croissance, des récepteurs et des

molécules d'adhésion. Etant donnée la diversité des substrats des métalloprotéases, la conséquence fonctionnelle de l'élagage extracellulaire dépend beaucoup de la protéine concernée. Ainsi, il est impliqué dans de nombreux phénomènes biologiques tels que l'inflammation, les cancers et les maladies rhumatoïdes. A travers quelques exemples, différents par leurs fonctions et par leurs implications, je vais aborder quelques conséquences majeures de l'action protéolytique d'une métalloprotéase sur son substrat.

### 1. Une solubilisation des facteurs de croissance pour réguler la signalisation des EGFR

L'échange de signaux de croissance et différenciation entre cellules est matérialisé par des facteurs de croissance diffusibles qui lient et activent des récepteurs spécifiques dans des cellules cibles. Tous les ligands des EGFR sont sous forme de précurseurs ancrés à la membrane [269]. Ainsi, en absence de protéolyse, ces ligands ne peuvent théoriquement activer qu'un récepteur sur une cellule immédiatement adjacente (signalisation juxtacrine) [270]. Par contre, pour atteindre un récepteur à distance (signalisation paracrine), le ligand doit être clivé pour libérer sa région extracellulaire (Figure 20). Les ADAMs sont impliquées dans l'élagage de 6 des 7 ligands connus des EGFR (TGF $\alpha$ , EGF, HB-EGF, betacellulin, epiregulin, amphiregulin). Ainsi, le clivage protéolytique de cette famille de ligands a un rôle clé dans la régulation de la signalisation des EGFR.



**Figure 20 : Implication de l'élagage dans la signalisation des ligands**  
Tiré de Blobel et al., 2005 [269]

## 2. Protéolyse de la molécule d'adhésion L1 pour la migration cellulaire

Les molécules d'adhésion cellulaire participent aux interactions cellule-cellule et cellule-matrice *via* leur domaine extracellulaire. L'élagage extracellulaire de ces molécules représente un point crucial dans la régulation dynamique de ce type d'interactions. Par exemple, L1 est une glycoprotéine composée de 6 domaines Immunoglobulin-like et de 5 répétitions de fibronectines III, exprimée dans les cellules neurales et épithéliales [271]. L1 agit *via* des liaisons homotypiques L1-L1 et hétérotypiques avec d'autres molécules d'adhésion cellulaire. Il a été montré que L1 est la cible des métalloprotéases, provoquant le relargage de son domaine extracellulaire. L'élagage extracellulaire de L1 peut être constitutif ou stimulé par des esters de phorbol, le vanadate ou l'HGF/SF et implique, selon le cas, l'ADAM10 ou l'ADAM17 [272-274].

La forme soluble de L1 peut promouvoir la migration cellulaire *via* deux mécanismes. D'abord, la forme soluble peut être immobilisée dans la matrice environnante par la liaison spécifique à la laminine [275] ou à des protéoglycanes [276]. Deuxièmement, les fragments solubles L1 peuvent directement interagir avec les cellules et stimuler la migration [277]. Cette protéolyse pourrait participer à l'augmentation de la migration cellulaire et à la progression métastatique dans les cancers [277, 278]. En effet, le relargage de L1 soluble a récemment été détecté dans des échantillons de serum de patients atteints de tumeurs ovariennes ou utérines [272, 279]. De plus, dans le système nerveux, ce domaine soluble de L1 relargué à partir de neurones en culture promeut la croissance des neurites et influence la différenciation neuronale [274].

## 3. Protéolyse de récepteurs

Pour les récepteurs membranaires, l'élagage extracellulaire, en plus de le rendre incapable de répondre à son ligand, peut avoir d'autres conséquences : relarguer des formes solubles empêchant (antagonistes) la formation de complexes de signalisation actifs [253] et générer une contrepartie transmembranaire/cytoplasmique qui reste accrochée à la membrane après élagage.

### a) Régulation de l'inflammation par la protéolyse des TNF récepteurs

Le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) est une cytokine sécrétée, suite à son élagage extracellulaire, par les cellules inflammatoires après infection ou blessure tissulaire. Cette cytokine induit une cascade de médiateurs incluant des molécules d'adhésion et d'autres cytokines. Les effets du TNF $\alpha$  sont médiés par le TNF-R1 [254]. La liaison du TNF $\alpha$  à son récepteur en induit l'élagage extracellulaire pour générer des récepteurs solubles [280-283]. Ainsi, l'élagage des TNF-R pourrait atténuer l'activité du TNF $\alpha$  au moins par deux voies :

d'abord, il diminue rapidement l'expression de TNF-R à la surface cellulaire et donc décroît la sensibilité de la cellule au ligand soluble TNF $\alpha$  [284]. Deuxièmement, une forme soluble de TNF-R est capable de lier les ligands, qui peut donc fonctionner comme un antagoniste pour le TNF $\alpha$  soluble. Ainsi, ce phénomène permet la régulation négative des réponses de l'inflammation [254].

De manière intéressante, le défaut de l'élagage de TNF-R, dû à des mutations extracellulaires, provoque une maladie inflammatoire nommée TRAPS (TNF-receptor-associated periodic febrile syndrome) [285]. TRAPS est une maladie héréditaire inflammatoire chronique qui affecte de multiples systèmes conduisant à des fièvres récurrentes. Dans la majorité des patients TRAPS, les mutations de TNF-R1 sont corrélées avec l'inhibition du clivage de l'ectodomaine de TNF-R1 après stimulation. Ainsi, le TNFR1 s'accumule à la surface cellulaire, ce qui augmente la sensibilité au TNF $\alpha$  et résulte dans des fièvres récurrentes par une augmentation des réponses inflammatoires. De plus, ce syndrome inflammatoire chronique peut être réverté chez la majorité des patients avec une thérapie neutralisant le TNF $\alpha$ . Ainsi, ces études établissent un lien clair entre le défaut d'élagage de TNF-R1 et la dérégulation de la réponse inflammatoire [285, 286].

#### *b) Protéolyse de HER2 (=ErbB2) et cancer*

Le récepteur tyrosine kinase HER2, de la famille des EGFR, ne possède pas de ligand connu mais est impliqué dans des réponses de prolifération et de transformation en interagissant avec les autres membres de la famille des EGFR. HER2 est surexprimé dans 30% des cancers du sein et est associé à l'agressivité tumorale [287]. L'implication de HER2 dans ces cancers, en plus de sa surexpression, peut également être liée à son élagage. En effet, il a été montré que HER2 est clivé par l'ADAM10 dans des cellules de cancer de sein surexprimant HER2 [288]. De hautes concentrations des produits de l'élagage de HER2, p110 (l'ectodomaine soluble) et p95 (le récepteur tronqué ancré à la membrane) ont été trouvés dans les cancers du sein humains et associés à un phénotype agressif [289], indiquant qu'un élagage excessif de HER2 peut contribuer à la transformation. En effet, il a été montré que la délétion du domaine extracellulaire de HER2 provoque l'augmentation de l'activité tyrosine kinase du fragment p95 ancré à la membrane, et en conséquence, de son potentiel transformant [290, 291]. Ainsi, l'inhibition sélective d'ADAM, bloquant le clivage du domaine extracellulaire de HER2, pourrait représenter un nouveau type d'approche pour traiter les patients atteints de cancers du sein avec surexpression de HER2. D'ailleurs, le trastuzumab (herceptin), un anticorps anti-HER2 conçu initialement pour bloquer la croissance des tumeurs surexprimant HER2, est également efficace pour inhiber le clivage de HER2 dans des cellules de cancer du sein [292]. Ainsi, les auteurs montrent une nouvelle

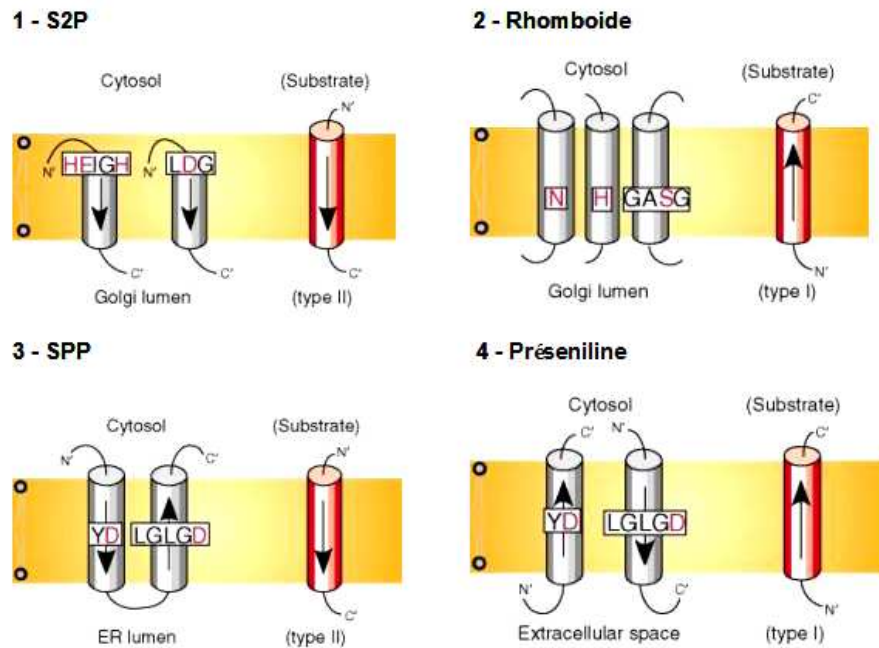
action de l'anti-tumoral trastuzumab en empêchant la production d'une forme tronquée constitutivement active de HER2.

*Nous l'avons vu, l'élagage de la partie extracellulaire d'une protéine peut conduire à son inactivation ou à son activation et intervenir, de ce fait, dans de nombreuses réponses biologiques. Ses fonctions sont d'autant plus importantes que ce clivage extracellulaire fait partie intégrante d'un autre processus nommé Protéolyse Intramembranaire Régulée (RIP pour regulated intramembrane proteolysis). En effet, nous allons voir que ce clivage extracellulaire peut être une étape initiale régulant la protéolyse de protéines transmembranaires dans leur région intramembranaire.*

### **III. La Protéolyse Intramembranaire Régulée dépendant des Présénilines**

#### ***A. Protéolyse intramembranaire régulée***

Ce type de protéolyse est médié par trois familles distinctes de protéases intramembranaires, qui clivent leurs substrats dans leur domaine transmembranaire. Ainsi, ce clivage conduit à la libération du domaine cytoplasmique de la protéine cible. Ces fragments sont souvent biologiquement actifs suite à leur translocation dans un nouveau compartiment cellulaire. Quatre protéases sont actuellement connues pour catalyser la protéolyse intramembranaire : les présénilines (PS) [293, 294] et les « site 2 protease » (S2P) [295, 296] furent les premières décrites alors que les rhomboides [297] et les « signal-peptide peptidase » (SPP) [298] ne furent isolées que récemment [299]. Toutes les protéases intramembranaires sont des protéines membranaires qui contiennent des résidus catalytiques au sein de leurs domaines transmembranaires (Figure 21). De plus, cette protéolyse médiée par ces protéases intramembranaires est régulée par deux mécanismes majeurs : pour les PS, SP, S2P, c'est l'élagage du domaine extracellulaire de la protéine qui va permettre le clivage intramembranaire. Par contre, les rhomboides clivent directement leurs substrats cibles, sans clivage préalable, et leur activité semble régulée par le trafic protéique.



**Figure 21 : Les quatre protéases intramembranaires .**  
Tiré de Weihofen et al., 2003 [300]

Ainsi, ces protéases présentent des caractéristiques communes, mais aussi divergentes, qui contribuent à la grande diversité des fonctions biologiques auxquelles participe la protéolyse intramembranaire régulée.

Par exemple, l'implication de S2P a largement été décrite dans la voie SREBP (sterol regulatory element-binding proteins), premier système de RIP pour lequel les protéases luminales et intramembranaires ont été identifiées. La protéolyse permet dans ce cas l'activation du facteur de transcription SREBP, normalement ancré à la membrane et libéré en réponse au cholestérol [301].

Le premier exemple de production de peptides actifs dépendant de SPP est la génération des épitopes HLA-E, qui jouent un rôle clé dans la surveillance immunitaire chez les humains [298].

La rhomboïde, quant à elle, semble requise pour l'établissement de l'axe dorsoventral et le développement du système nerveux périphérique chez la drosophile [302]. En effet, les rhomboïdes induisent la libération du facteur de croissance Spitz chez la Drosophile et l'initiation de la signalisation de l'EGFR [302, 303].

Les présénilines touchent un nombre plus varié de substrats, notamment des récepteurs, et par conséquent, régulent de nombreuses fonctions biologiques. Dans le prochain paragraphe, nous allons détailler les mécanismes de protéolyse dépendant des présénilines ainsi que leurs implications biologiques par quelques exemples représentatifs.

## ***B. Protéolyse Intramembranaire Régulée dépendant des Présénilines (PS-RIP)***

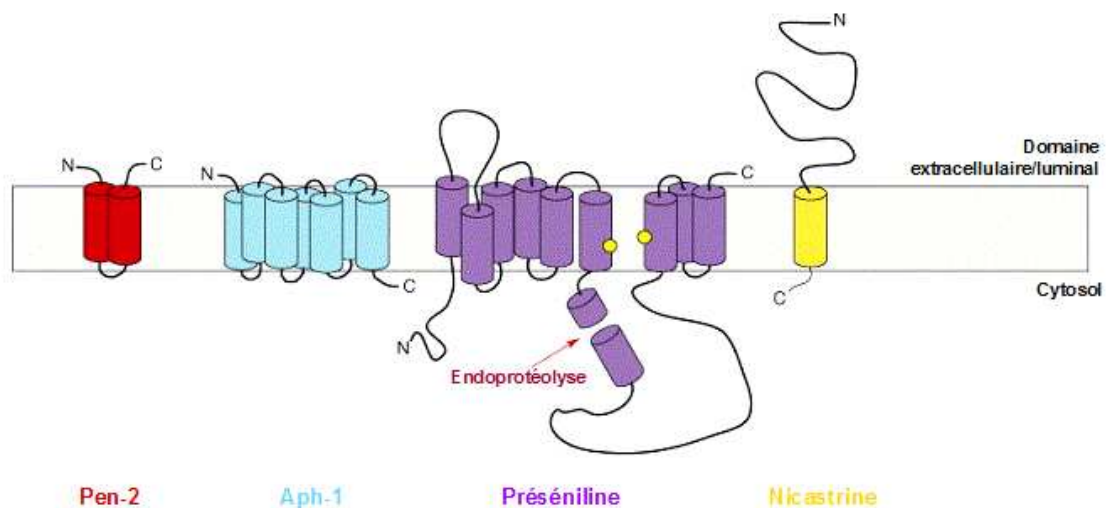
### **1. Une première étape de clivage extracellulaire**

Comme nous l'avons vu, la protéolyse intramembranaire dépendant des présénilines nécessite un clivage préalable. Ce premier clivage peut avoir lieu dans la lumière du Réticulum Endoplasmique ou à la surface cellulaire, et conduit souvent à l'élagage du domaine extracellulaire typiquement réalisé par les protéases de la famille ADAM, notamment ADAM9, ADAM10 ou ADAM17/TACE mais aussi par la  $\beta$ -secrétase BACE ( $\beta$ -site APP-cleaving enzyme). Ce premier clivage réduit le domaine extracellulaire à moins de 30 Acides Aminés, ce qui va permettre le second clivage par le complexe  $\gamma$ -secrétase qui contient la préséniline [304-306]. Par contre, si le clivage intramembranaire par les présénilines requiert un clivage préalable de son substrat, il ne semble pas nécessiter de spécificité de séquence.

### **2. La $\gamma$ -secrétase, un complexe actif**

#### *a) Un complexe multiprotéique*

Le complexe  $\gamma$ -secrétase a été décrit comme un complexe multiprotéique composé de la préséniline (PS), la nicastrine (NCT), APH1 (anterior pharynx defective-1) et PEN-2 (presenilin enhancer -2) (Figure 22). La famille préséniline est constituée de deux membres proches, PS1 et PS2, et un plus éloigné, SPP. Les PS sont des aspartyl protéases qui adoptent une topologie membranaire particulière puisqu'elles traversent la membrane à de multiples reprises, *via* leurs domaines transmembranaires [307, 308]. Entre les domaines transmembranaires 6 et 7, où se situent les résidus catalytiques (cerclés en jaune sur la Figure 22), une large boucle hydrophilique est le siège d'une endoprotéolyse [309]. En effet, les présénilines sont d'abord synthétisées à l'état d'holoprotéine intacte mais les formes matures et fonctionnelles de PS1 et PS2 consistent en un hétérodimère formé des fragments C et N-terminaux issus de cette endoprotéolyse [310-312]. APH-1 stabilise l'holoprotéine préséniline en collaboration avec la nicastrine (NCT), alors que PEN-2 est responsable de la maturation finale du complexe  $\gamma$ -secrétase, conférant son activité et induisant l'endoprotéolyse de la préséniline. Il a été montré que la nicastrine a d'autres fonctions dans le complexe  $\gamma$ -secrétase [313]. En effet, elle fonctionne, *via* son ectodomaine, comme un récepteur qui reconnaît les courtes séquences d'acides aminés générées par le clivage de l'ectodomaine et *via* sa région transmembranaire participe à l'assemblage du complexe  $\gamma$ -secrétase.



**Figure 22 : Modèle topologique du complexe  $\gamma$ -sécrétase.**  
Tiré de Lundkvist et al., 2006 [314]

Des études biochimiques ont montré que si chaque composant du complexe a son propre rôle, ils sont tous requis pour permettre une activité  $\gamma$ -sécrétase. En effet, Edbauer et ses collaborateurs [315] surexprimèrent la PS1 avec la nicastrine, APH-1 et PEN-2 en levure, un organisme qui ne possède pas ces protéines, et observèrent une activité  $\gamma$ -sécrétase *in vitro*, ce qui suggère fortement que PS, NCT, APH-1 et PEN-2 sont suffisants pour reconstituer l'activité  $\gamma$ -sécrétase. De plus, la co-expression de ces 4 composants augmente l'activité  $\gamma$ -sécrétase dans des cellules transfectées [315-318].

#### b) *Activité portée par PS1/PS2*

Il a été démontré que les PS1 ou PS2 sont essentielles pour l'activité  $\gamma$ -sécrétase et semblent servir de composants catalytiques dans le complexe  $\gamma$ -sécrétase [319-322]. Les premiers indices pour le rôle des PS dans l'activité  $\gamma$ -sécrétase vinrent des analyses génétiques des familles avec une maladie d'Alzheimer d'origine héréditaire [323]. En effet, dans la majorité des cas, cette maladie est due à des mutations dans un des deux gènes codant la PS. De plus, les études démontrèrent le rôle essentiel de ces protéines dans le clivage  $\gamma$ -sécrétase. La déficience en PS1 diminue l'activité  $\gamma$ -sécrétase de 80%, celle de PS2 a peu d'effet et la double déficience de PS1 et PS2 abolit l'activité  $\gamma$ -sécrétase [324-327]. Des mutations de résidus aspartate, situés dans deux régions transmembranaires adjacentes conservées, produit des dominants négatifs de PS qui inhibent l'activité  $\gamma$ -sécrétase dans les cellules [294]. Enfin, les inhibiteurs de l'activité  $\gamma$ -sécrétase ciblent à la fois les PS1 et 2 [328-331].



### c) Substrats multiples

La liste des substrats de PS-RIP ne cesse de s'allonger (Figure 23). Même si ce clivage ne cible que des protéines transmembranaires, elles peuvent avoir des fonctions variées. La PS-RIP module ainsi une grande variété de voies de signalisation *via* deux mécanismes majeurs : génération de domaines intracellulaires (ICD) actifs (signalisation nucléaire) et inactivation d'effecteurs membranaires (signalisation non nucléaire). En choisissant quelques exemples de substrats, je décrirai les différentes implications que peut avoir la PS-RIP (exemples choisis surlignés en jaune dans le tableau Figure 23).

Substrat	Rôle des substrats	Fragment	Nucléaire	Conséquence fonctionnelle
APLP1 and APLP2	APP family member	ALID	Yes	Transcriptional activity
APOER2	Lipoprotein receptor family member; signaling	ND	Yes	Regulation of signaling
APP	Synaptic function	AICD	Yes	Transcriptional activity
CD44	Cell adhesion	CD44ICD	Yes	Transcriptional regulation
CSF1	Receptor tyrosine kinase; cell division and differentiation	ND	Yes	ND
DCC	Netrin-1 receptor; axon guidance; cell survival	DCC-ICD	Yes	Transcriptional activity; attenuation of signaling
Delta	Notch pathway ligand	DIICD	Yes	Regulation of cell proliferation
E-cadherin	Cell adhesion	E cad/CTF2	No	Regulation of cell adhesion; APP degradation; $\beta$ -catenin localization
Ephrin-B1	Ligand for ephrin-B-related receptor tyrosine kinase	ND	Yes	Regulation of actin polymerization
Ephrin-B2	Ligand for ephrin-B-related receptor tyrosine kinase	E phrinB2/CTF 2	ND	Phosphorylation of Src
ERBB4	Receptor tyrosine kinase	B4ICD, E 4ICD, 4ICD	Yes	Transcriptional regulation; apoptosis
$\gamma$ -Protocadherin	Synaptic connections	$\gamma$ -ICD or Pcdhg-CTF2	Yes	Transcriptional activity
GHR	Cytokine receptor	GHR stub	Yes	ND
GluR3	Multipass transmembrane glutamate receptor; neurotransmission	ND	No	Modulation of receptor activity
HLA-A2	MHC class I protein	HLA-A2 ICD	ND	Degradation of HLA-A2
Jagged	Notch pathway ligand	JICD	Yes	Transcriptional activity
LRP1	Lipoprotein receptor family member; endocytosis; signaling	LRP1 ICD	Yes	Transcriptional regulation
N-cadherin	Cell adhesion	Ncad/CTF2	Yes	Regulation of cell adhesion; CBP degradation; $\beta$ -catenin localization
Nectin 1 $\alpha$	Synaptic connections	NE-ICD	No	Regulation of cell adhesion
Notch	Notch pathway receptor	NICD	Yes	Transcriptional activity
NRADD	Apoptosis	NRICD	Yes	ND
p75 <sup>NTR</sup>	Neurotrophin receptor	p75 ICD	No?	Activation of Rho; cell survival; transcriptional regulation
SCNB2	Subunit of voltage-gated sodium channel; cell adhesion	$\beta$ 2-ICD	No	Regulation of cell adhesion and migration
Syndecan 3	Heparan sulfate proteoglycan	SICD	ND	No transcriptional activity; cleavage might control localization of associated proteins (e.g. CASK)
Tyrosinase, TYRP1 and TYRP2	Pigment synthesis	ND	ND	Pigment regulation; tyrosinase localization

Figure 23 : Liste des substrats de la préséniline

Tiré de Parks et al., 2007 [332]

### 3. Quelques exemples clés de protéines clivées par PS-RIP

#### a) APP et la maladie d'Alzheimer

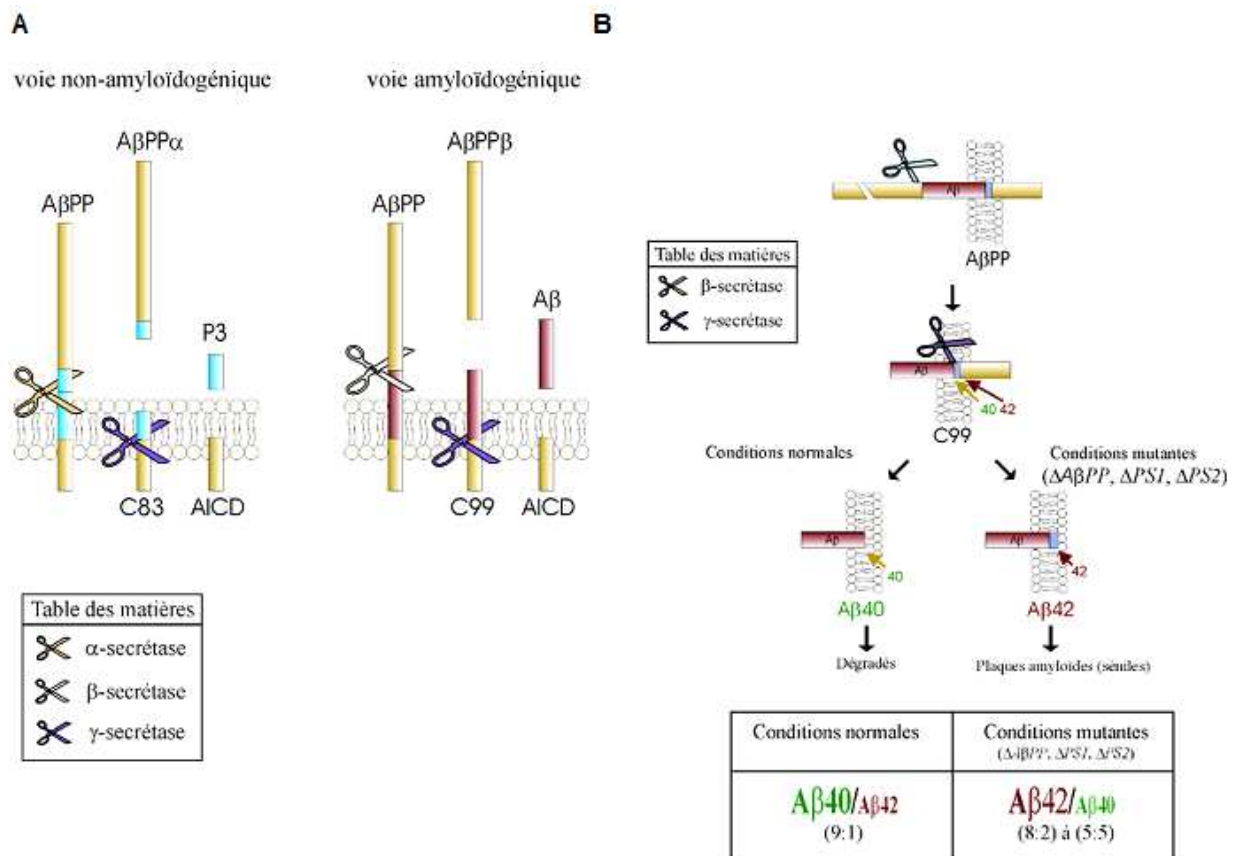
Nous l'avons vu, la maladie d'Alzheimer est souvent causée par des mutations dans les gènes des PS mais également de la protéine APP. Cette maladie est caractérisée par une dystrophie des neurites, une perte des synapses, une dégénération neuronale progressive [333] et l'apparition de plaques amyloïdes dans le cerveau de patients atteints de cette maladie.

La protéine APP est une protéine transmembranaire de type 1 munie d'un large domaine extracellulaire et d'un court segment intracellulaire. La protéine APP est métabolisée de façon constitutive *via* deux voies biologiques : la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique (Figure 24) [334-336]. Ces deux voies se distinguent principalement par les enzymes qui clivent APP et par les fragments produits. En bref, la voie plus commune dite non-amyloïdogénique (c'est à dire qui ne produit pas de peptides amyloïdes) est caractérisée par deux clivages endoprotéolytiques orchestrés par l' $\alpha$ -secrétase, de la famille des métalloprotéases ADAM, puis la  $\gamma$ -secrétase, ayant comme résultat final la production de trois fragments distincts : la partie APP soluble  $\alpha$  (A $\beta$ PPs- $\alpha$ ), le domaine AICD («APP intracellular domain») et le peptide p3 (Figure 24A). Alternativement, APP peut être clivée par la  $\beta$ -secrétase BACE, suivi pareillement par la  $\gamma$ -secrétase, pour produire d'autres fragments dont les peptides amyloïdes (la voie amyloïdogénique): la partie APP soluble  $\beta$  (A $\beta$ PPs- $\beta$ ), le domaine AICD et les peptides A $\beta$  [337-339].

En réalité il existe deux formes majeures de peptides amyloïdes : A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42, conséquence de l'existence de deux sites de clivage par la  $\gamma$ -secrétase. Par un mécanisme encore mal compris, presque la totalité des mutations associées aux formes familiales de la maladie d'Alzheimer altèrent l'activité et/ou la spécificité de la  $\gamma$ -secrétase de façon à favoriser la production de l'amyloïde A $\beta$ 42, composant majeur des plaques séniles et agent pathogénique clé de la maladie d'Alzheimer (Figure 24B). Dans des conditions dites normales la production des peptides A $\beta$ 40 est favorisée par rapport à A $\beta$ 42 avec un facteur d'environ 9. Les mutations associées aux formes familiales de la maladie d'Alzheimer ont pour effet de modifier le rapport et non la quantité des peptides A $\beta$ 42 produits.

De plus, bien que la fonction biologique de APP soit encore mal connue, il a été montré que le fragment AICD est impliqué dans la transmission des signaux de la membrane vers le noyau. En effet, l'AICD, instable, possède une activité transcriptionnelle faible [340]. L'AICD peut former des complexes transcriptionnellement actifs avec Fe65, un adaptateur protéique, [341-343] et Tip60, une histone acétyltransférase qui fonctionne dans le remodelage de la chromatine et la réparation de l'ADN [344, 345]. Il a été montré que le complexe ternaire

AICD/Fe65/Tip60 peut déplacer le complexe répresseur N-CoR et activer les gènes régulés par NFkB [346]. De manière intéressante, l'accumulation de fragments Aβ42 due aux mutations PS a été corrélée à une diminution de la génération de AICD [304]. Il serait possible que les mutations des PS dans la maladie d'Alzheimer n'influencent pas seulement la génération des différents Aβ mais affectent également les signalisations médiées par AICD. En effet, la suppression chronique de la transactivation de NFkB médiée par AICD dans la maladie d'Alzheimer pourrait accroître la sensibilité aux effets neurotoxiques de Aβ42, NFkB étant impliqué dans la régulation de gènes neuroprotecteurs [304].



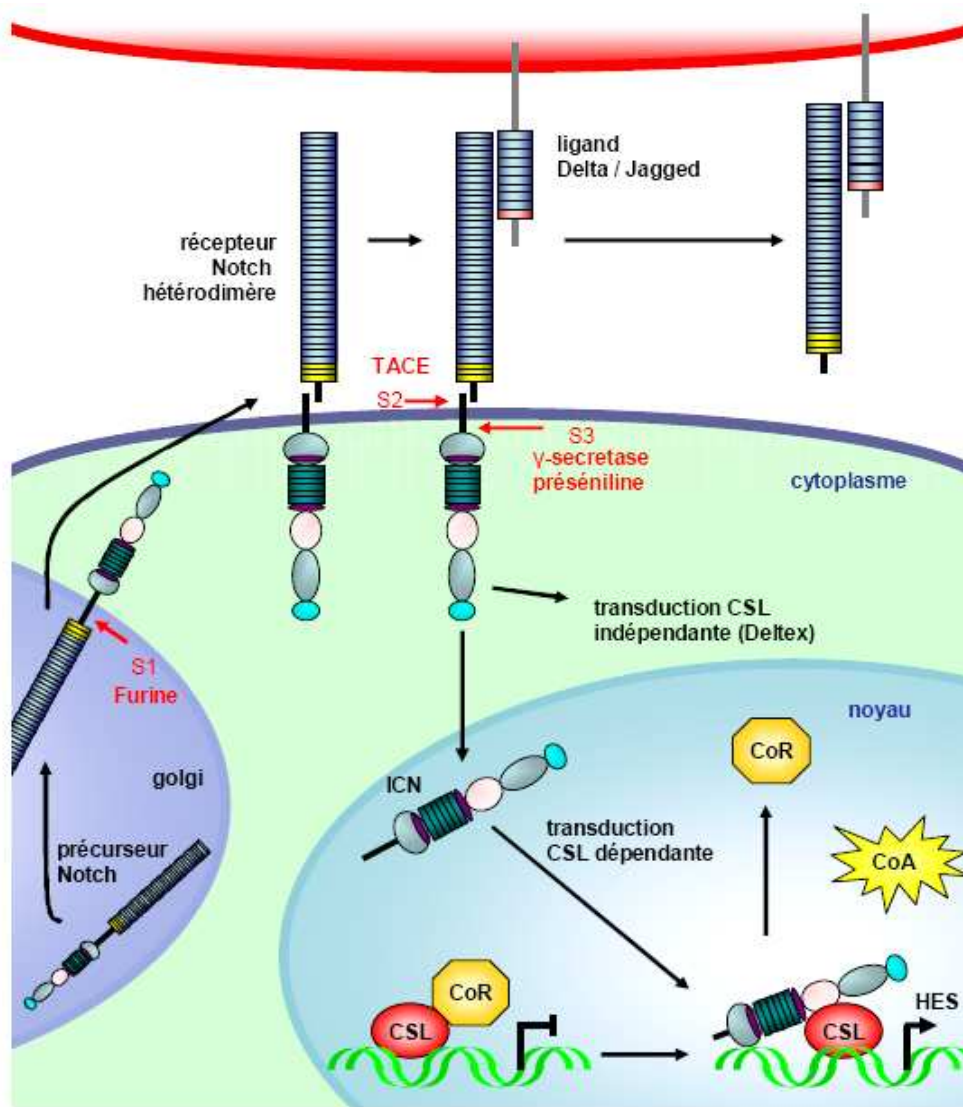
**Figure 24 : Métabolisme de APP et génération de peptides.**

A – Clivages lors des voies amyloïdogénique et non-amyloïdogénique. B – Les mutations associées aux formes familiales de la maladie d'Alzheimer et le clivage γ-sécrétase.

### *b) Signalisation nucléaire de Notch et développement*

Le rôle de PS-RIP dans la signalisation nucléaire a surtout été décrit pour Notch. Le récepteur Notch est une protéine membranaire de type 1 (son côté N-terminal dans la lumière et C-terminal dans le cytosol). Elle est munie d'un large domaine extracellulaire composé de répétitions en tandem de motifs EGF-like, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire muni de six domaines ankyrine répétés [347, 348]. Ce récepteur est synthétisé sous forme d'un précurseur de 300 kDa, qui est clivé constitutivement dans le Golgi par une furine (clivage S1) [349]. Ce clivage conduit à la formation de deux sous-unités : une sous-unité extracellulaire et une sous-unité transmembranaire qui restent associées de manière covalente sous forme d'hétérodimère [350]. L'hétérodimère est adressé à la surface cellulaire et reste inactif jusqu'à ce qu'il lie un de ses ligands résidant à la surface d'une autre cellule et appartenant à la famille des Delta/Jagged/Serrate/LAG-2. La voie de signalisation Notch définit un mécanisme d'interactions cellulaires qui s'exerce essentiellement entre cellules voisines et qui contrôle de nombreux processus développementaux, parmi lesquels le choix de l'identité cellulaire, la prolifération, la différenciation et l'apoptose.

La liaison du ligand entraîne un changement conformationnel de l'hétérodimère qui permet le clivage de la sous-unité transmembranaire par TACE/ADAM17 (clivage S2) (Figure 25) [351]. Le fragment C-terminal résultant de Notch, NEXT (Notch extracellular membrane truncation) est ensuite clivé dans son domaine transmembranaire par la  $\gamma$ -secrétase (clivage S3) pour relarguer le fragment NICD (Notch Intracellular Domain). Ce fragment est ensuite adressé au noyau grâce à la présence de signaux de localisation nucléaire (NLS) où il active la transcription de gènes spécifiques impliqués dans le développement [352, 353]. En effet, NICD est muni d'un domaine activateur de la transcription mais ne lie pas directement l'ADN. Dans le noyau, NICD va convertir le répresseur transcriptionnel CSL (C-promoter binding factor/Suppressor of Hairless/Lag-1 transcription factor) en activateur transcriptionnel par interactions protéine-protéine [354-356]. Ainsi, Notch active la transcription de gènes cibles comme les facteurs de transcription de la famille HES (Hairy/Enhancer of Split) [357-359]. Les facteurs HES constituent une famille de répresseurs transcriptionnels de type bHLH (basic helix-loop-helix), importants dans la neurogenèse et l'hématopoïèse [360]. Ils régulent négativement l'expression de facteurs de transcription tissus spécifiques [361, 362] tels que les gènes neurotrophiques dans le système nerveux.



**Figure 25 : La voie de signalisation canonique de Notch impliquant une PS-RIP.**  
Tiré de Selkoe et al., 2003 [363]. (NICD = ICN)

*c) ErbB4, une autre signalisation pour le récepteur tyrosine kinase*

ErbB4 est un récepteur tyrosine kinase membranaire de type 1, appartenant à la famille des récepteurs à l'EGF, qui est activé par des facteurs de croissance tels que la néuréguline (NRG) [364]. Classiquement, la liaison de son ligand dans sa région extracellulaire provoque la dimérisation et autophosphorylation de ErbB4 ce qui conduit au recrutement de protéines de signalisation (Figure 26). La signalisation de ErbB4 contrôle la prolifération et la différenciation cellulaires et a été impliquée dans plusieurs processus biologiques tels que le développement cardiovasculaire, de la glande mammaire et des astrocytes [364-366].

Un autre mécanisme de signalisation existe pour ErbB4 qui dépend de la PS-RIP. En effet, la liaison de NRG à ErbB4 stimule le clivage extracellulaire médié par TACE/ADAM17, relarguant un ectodomaine de 120 kDa et un fragment ancré à la membrane de 80 kDa, qui subit ensuite un clivage  $\gamma$ -secrétase libérant une forme activée du domaine intracellulaire de ErbB4 (E4ICD) [367]. E4ICD transloque dans le noyau grâce à des domaines NLS et présente une très faible activité transcriptionnelle lorsqu'il est couplé artificiellement à un domaine de liaison à l'ADN Gal4 [367-369]. Cependant, ce fragment participe à une signalisation nucléaire pour contrôler divers processus biologiques.

Par exemple, E4ICD régule la cinétique de l'astrogenèse dans le cerveau en développement [370]. En effet, l'induction du clivage de ErbB4 par NRG1 résulte dans l'association de E4ICD avec les protéines de signalisation TAB2 (TAK1-binding protein 2) et le corépresseur transcriptionnel N-CoR (Figure 26) [370]. Ce complexe transloque dans le noyau de précurseurs neuronaux et inhibe leur différenciation en astrocyte. En effet, le complexe se fixe sur le promoteur de différents gènes gliaux qui sont requis pour la différenciation en astrocytes, tels que GFAP et S100 $\beta$ , et en inhibe la transcription [370, 371].

D'autre part, ErbB4 est également essentiel pour l'initiation de la lactation et peut provoquer la différenciation de cellules mammaires en culture [372-374]. Cette capacité de ErbB4 à réguler la différenciation dans la glande mammaire a été attribuée à la localisation nucléaire de E4ICD [373]. En effet, la forme nucléaire E4ICD est observée uniquement dans la glande mammaire en lactation. Il a été montré que E4ICD s'associe directement avec un complexe de transcription, incluant STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5A), au niveau du promoteur du gène de la  $\beta$ -caséine. Ainsi, E4ICD fonctionne comme une molécule chaperonne pour STAT5, lui permettant de transloquer dans le noyau et d'induire la transcription de la  $\beta$ -caséine [375].

D'autres protéines interagissant avec E4ICD ont été trouvées, élargissant encore les implications fonctionnelles de la signalisation nucléaire, de répression ou d'activation, de ErbB4 [376, 377].

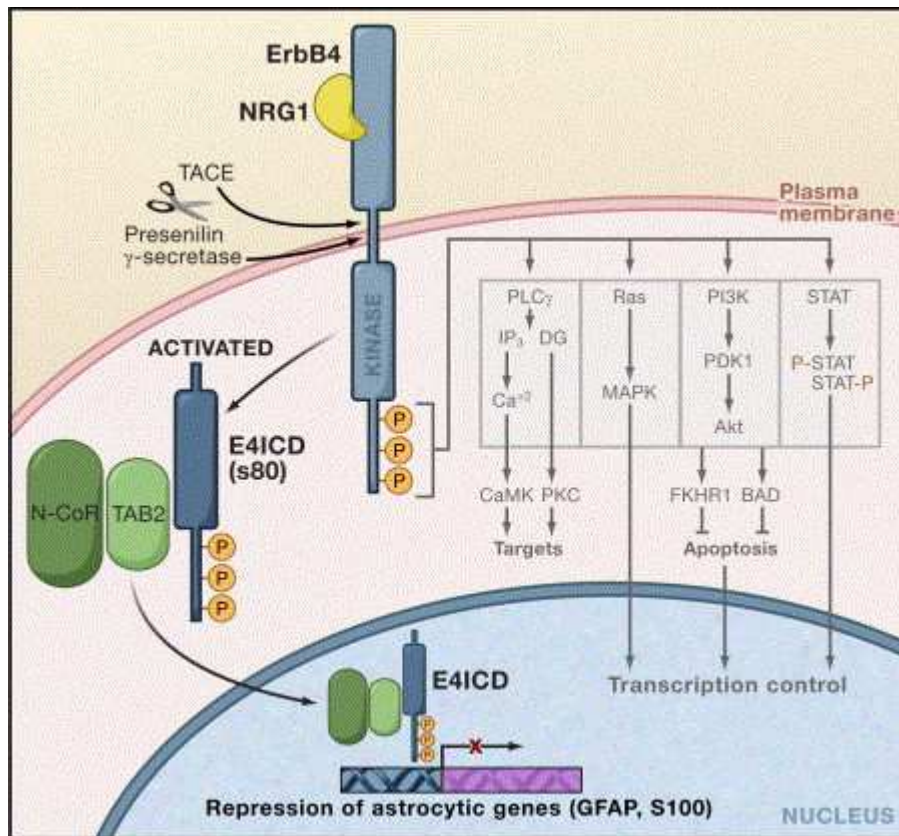


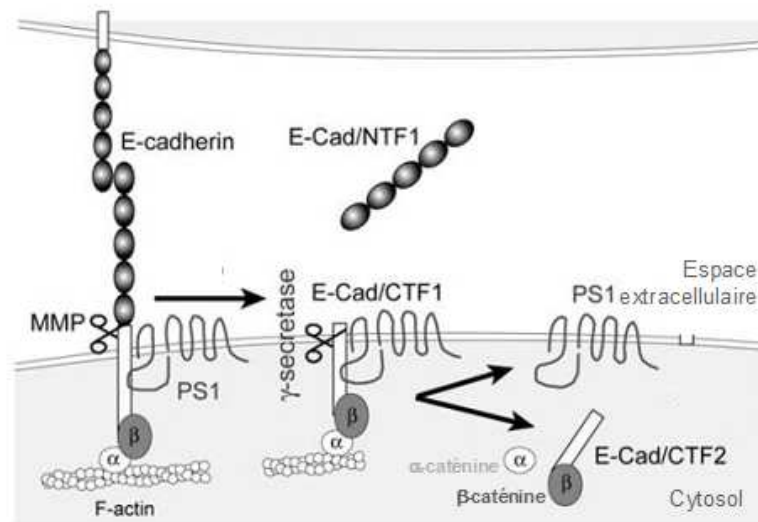
Figure 26 : Voies de signalisation canonique et nucléaire de ErbB4.  
Tiré de Schlessinger et al., 2006 [371]

d) *E-cadhérine et une signalisation non nucléaire*

Dans des jonctions adhérentes basées sur les cadhérines (CAJ, cadherin-based adherens junctions), les domaines extracellulaires des cadhérines transmembranaires promeuvent l'adhésion cellule-cellule, alors que leurs domaines cytoplasmiques sont liés au cytosquelette *via* les  $\alpha$ - et  $\beta$ -caténines [378, 379]. Or la perte de contact cellule-cellule est un des changements morphologiques observés en absence de calcium ou après l'induction d'apoptose. Dans ces conditions, les cadhérines, qui représentent un système d'adhésion majeur, vont être la cible de protéolyse, conduisant au désassemblage des CAJ [380, 381]. En effet, l'induction de l'apoptose provoque la PS-RIP de la E-cadhérine générant les fragments E-cad/CTF1 et E-cad/CTF2 [382]. Le fragment E-cad/CTF1 est issu du clivage extracellulaire par une MMP, générant conjointement un fragment soluble E-cad/NTF1. E-cad/CTF1 est ensuite pris en charge par la PS1/ $\gamma$ -secrétase à l'interface membrane-cytosol pour générer le fragment E-cad/CTF2. Ce fragment est libéré dans le cytosol, complexé à la  $\beta$ -caténine, ce qui conduit à leur dissociation du cytosquelette et à une augmentation du taux de  $\beta$ -caténine soluble, élément clé de la voie de signalisation Wnt. Cependant, étant

séquestrée par E-cad/CTF2, la  $\beta$ -caténine ne peut pas transloquer dans le noyau et activer l'expression de gènes en formant des complexes avec les facteurs de transcription Lef-1/Tcf [383]. Marambaud et al [382] suggèrent que le relargage du complexe cytosolique E-cad/CTF2-caténine pourrait fournir un pool cytosolique de  $\beta$ -caténine inactive, disponible en cas de besoin transcriptionnel.

Cette protéolyse de la E-cadhérine promeut donc la dissociation des CAJ en agissant à différents niveaux, extracellulaire et intracellulaire, mais n'est pas connue pour générer un domaine de signalisation nucléaire.



**Figure 27 : Représentation schématique du désassemblage des CAJ médié par le clivage de la E-cadhérine par la  $\gamma$ -secrétase.**

Tiré de Marambaud et al., 2002 [382]



# RESULTATS ET DISCUSSION

## Première partie : MET, une cible fonctionnelle des caspases

### **I. Introduction**

Le récepteur tyrosine kinase MET, comme nous l'avons vu dans l'introduction, est classiquement associé à la survie cellulaire. Cependant, lorsque je suis arrivée dans le laboratoire, un clivage spécifique de MET par les caspases venait d'être découvert [384]. En effet, l'exposition à plusieurs types de stress induit le clivage de MET dépendant des caspases dans les cellules épithéliales, des hépatocytes primaires et des neurones corticaux. Le clivage a lieu au niveau de l'acide aspartique 1000 situé au sein d'un site consensus pour les caspases (ESVD) dans sa région juxtamembranaire. Ce clivage génère deux fragments : un fragment extracellulaire de 100 kDa (p100 MET) et un fragment intracellulaire de 40 kDa (p40 MET) contenant le domaine kinase. Il a été montré que p40 MET peut induire l'apoptose après transfection dans des cellules MDCK ou dans des neurones corticaux embryonnaires [384]. De plus, un mutant de p40 MET sans activité kinase est incapable d'induire l'apoptose, indiquant que la propriété pro-apoptotique de p40 MET dépend de son activité tyrosine kinase. Par ailleurs, la génération de p40 MET en réponse à un stress est inhibée par un pré-traitement à l'HGF/SF, de façon cohérente avec les capacités anti-apoptotiques de l'HGF/SF. Par conséquent, loin d'inactiver le récepteur MET, ce clivage protéolytique convertit le récepteur de survie en facteur de mort.

Ainsi, dans un premier temps, je me suis penchée sur p40 MET afin d'en connaître ses caractéristiques. En étudiant de plus près ce fragment, nous avons découvert un autre site de clivage par les caspases sur MET. Même si ce clivage ne retire que quelques acides aminés en C-terminal, nous verrons que ce clivage est néanmoins essentiel.

## **II. Résultats : Amplification de l'apoptose par clivage séquentiel du récepteur tyrosine kinase MET par les caspases.**

### ***A. Publication 1***

Titre : **Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor.** [385]

Dans cet article, nous avons montré que, durant l'apoptose, le récepteur MET n'est plus reconnu par des anticorps dirigés contre sa région C-terminale, suggérant un autre clivage de MET (Figure 1). En analysant la séquence C-terminale de MET et en inactivant le site identifié par mutagenèse, nous avons confirmé son clivage par la caspase 3 au niveau de l'acide aspartique 1374 (Figures 2 et 4). De manière intéressante, systématiquement, moins de p40 MET est généré à partir d'un récepteur muté (non clivable en C-terminal) qu'à partir d'un récepteur sauvage (Figure 3). Ainsi, la mutation du site caspase C-terminal de MET défavorise celui juxtamembranaire, révélant une organisation hiérarchique des clivages. De plus, au cours de l'apoptose, le clivage C-terminal génère une forme membranaire de MET uniquement tronquée en C-terminal qui devient majoritaire durant l'apoptose (Figure 5).

Pour évaluer la pertinence biologique de ce clivage C-terminal sur p40 MET, nous avons comparé p40 MET à une forme de p40 MET contenant l'extrémité C-terminale. Par marquage de la caspase 3 active en immunofluorescence et par test de formation de colonies, nous avons montré que le clivage C-terminal de p40 MET augmente ses capacités pro-apoptotiques (Figure 6). Enfin, en comparant des cellules exprimant stablement un récepteur sauvage ou muté soumises à un stress, nous avons montré que l'inhibition du clivage C-terminal conduit à la diminution de la génération de p40 MET et à une résistance à la mort cellulaire, suggérant un rôle d'amplificateur de l'apoptose pour p40 MET (Figure 7).

Ces résultats révèlent donc des clivages caspases de MET en deux étapes transformant un récepteur de survie en facteur de mort capable d'amplifier l'apoptose.

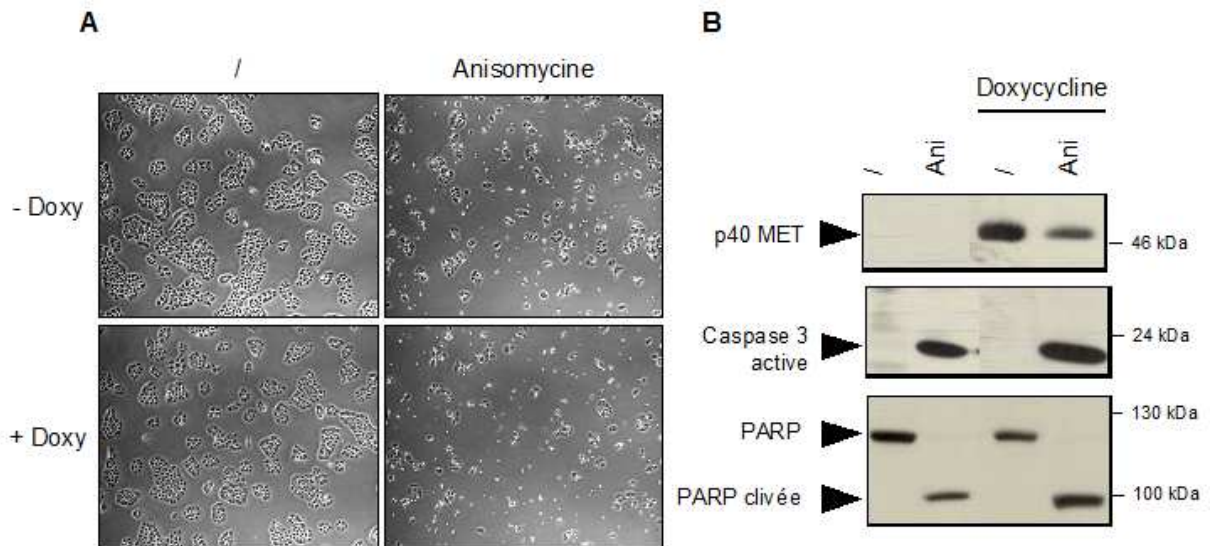
## ***B. Résultats complémentaires : p40 MET, un amplificateur plutôt qu'un inducteur d'apoptose***

Nos travaux sur les clivages caspases du récepteur MET en deux étapes a permis de révéler un rôle d'amplification de l'apoptose par le fragment p40 MET. Une autre façon d'aborder cette question d'amplification aurait été d'établir des lignées cellulaires exprimant stablement p40 MET et de comparer leur cinétique d'apoptose à celle de cellules sauvages, suite à un stress. Malheureusement, l'obtention de telles cellules est impossible (Figure 6 de la référence [385]). En effet, la totalité des cellules transfectées par p40 MET et sélectionnées par la G418 (le vecteur d'expression contenant un gène de résistance à cet antibiotique) meurt après une dizaine de jours, ce qui est cohérent avec les fonctions pro-apoptotiques de p40 MET. Une alternative était alors d'établir des lignées cellulaires transfectées par un vecteur exprimant p40 MET de manière inductible.

Pour ce faire, nous avons utilisé un système Tet-ON et plus particulièrement le vecteur pSTAR [386]. En effet, contenant l'ensemble des éléments constituant un système TetON, ce vecteur a le grand avantage de permettre l'obtention de stables inductibles en une seule étape de sélection. Ainsi, sur ces cellules, l'ajout de tétracycline permet d'induire l'expression de notre gène d'intérêt : la tétracycline s'associe avec l'activateur transcriptionnel et ce complexe activateur se fixe alors sur le promoteur régulant l'expression du gène d'intérêt. En utilisant ce système, nous avons donc obtenu des cellules MDCK exprimant p40 MET en présence de tétracycline.

Nous avons utilisé ces cellules stables inductibles pour étudier, plus directement que dans la publication, le rôle de p40 MET dans l'amplification du processus apoptotique. Tout d'abord, nous avons constaté que la présence de doxycycline, un analogue de la tétracycline, ne provoque en aucun cas la mort des cellules (Figure 28 A). Ainsi, malgré l'induction de l'expression de p40 MET, nous ne détectons pas de signe d'apoptose. Par contre, lorsque l'on traite les cellules avec l'inducteur d'apoptose anisomycine, on remarque plus de cellules mortes en présence de doxycycline ainsi qu'une activation de la caspase 3 et un clivage de PARP (Poly ADP Ribose Polymerase) plus marqués (Figure 28 A et B). Dans ce cas, p40 MET semble optimiser les effets apoptotiques d'un inducteur d'apoptose en sensibilisant les cellules.

Ainsi, p40 MET n'est pas suffisant pour initier un processus apoptotique. Cependant il permet l'amplification de l'apoptose lorsqu'elle est amorcée. Puisque p40 MET est généré par clivage de MET par la caspase 3, il faut donc que le processus apoptotique soit déjà engagé pour que p40 MET soit libéré. Dans ces conditions, les capacités d'amplification de l'apoptose par p40 MET semblent cohérentes.



**Figure 28: Amplification de l'apoptose par l'induction de l'expression de p40 MET.**

A et B - Les cellules stables MDCK pSTAR-p40 MET sont traitées ou non sur la nuit avec de la doxycycline (2 µg/ml). Le lendemain, les cellules sont traitées ou non à l'anisomycine (50 µM). Avant lyse, les cellules sont photographiées (A) puis, les extraits protéiques sont séparés sur gel SDS-PAGE et transférés sur membrane PVDF. La membrane a été incubée avec les anticorps indiqués (B).

Ainsi, nous avons montré que deux clivages de MET par les caspases permettent la génération du fragment p40 MET pro-apoptotique. Pour autant, les mécanismes que ce fragment met en œuvre pour amplifier l'apoptose ne sont pas connus. Nous avons donc étudié p40 MET afin de savoir comment les capacités de survie de MET sont transformées en capacités pro-apoptotiques.

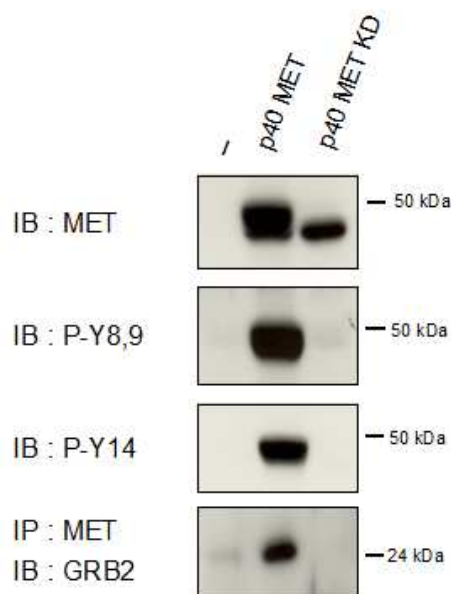
### III. Résultats complémentaires

Titre : **Régulation des capacités apoptotiques de p40 MET par sa dimérisation.**

#### ***A. L'activité kinase est essentielle pour les capacités apoptotiques de p40 MET***

Le fragment p40 MET, comme nous l'avons vu précédemment, est un fragment intracellulaire contenant le domaine tyrosine kinase de MET. Il a été montré que le fragment p40 MET transfecté transitoirement en cellules MDCK est constitutivement phosphorylé, tout au moins sur les tyrosines 8 et 9 du domaine kinase et sur la tyrosine 14 qui fait partie du site de recrutement C-terminal multisubstrat de MET (Figure 6 de la référence [384] + Figure 29). Néanmoins, nous n'avons pas pu confirmer cette phosphorylation de p40 MET sur le fragment endogène créé durant l'apoptose. Nous pouvons imaginer que le niveau de phosphorylation soit dans ce cas trop faible pour être détecté avec les anticorps dont nous disposons. Il est également possible que la surexpression obtenue en transfection transitoire favorise la capacité de p40 MET à se phosphoryler. De plus, par des expériences de co-immunoprécipitation, nous avons montré qu'un p40 MET transfecté transitoirement est capable de recruter Grb2 ainsi que Gab1 (résultat non montré), deux protéines majeures dans la signalisation de MET (Figure 29).

De manière attendue, un p40 MET sans activité kinase (p40 MET Kinase Dead = p40 MET KD) n'est plus phosphorylé sur ces mêmes tyrosines et perd ses capacités de recrutement. De plus, alors qu'un p40 MET transfecté transitoirement induit l'apoptose en activant la caspase 3, son homologue sans activité kinase en est incapable (Figure 6 de la référence [384]). Ainsi, l'activation de la caspase 3 par p40 MET est un processus actif qui requiert son activité tyrosine kinase.



**Figure 29: Phosphorylation et recrutement de p40 MET.**

Des MDCK ont été transfectées par pcDNA3, p40 MET ou p40 MET KD. Les cellules ont été cultivées ensuite dans du DMEM 10% FBS (Fetal Bovine Serum). Après lyse des cellules, les protéines ont été séparées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12,5%. Après transfert, les protéines et leurs formes phosphorylées ont été révélées par les anticorps appropriés.

### ***B. La forme constitutivement active TPR-MET n'induit pas l'apoptose***

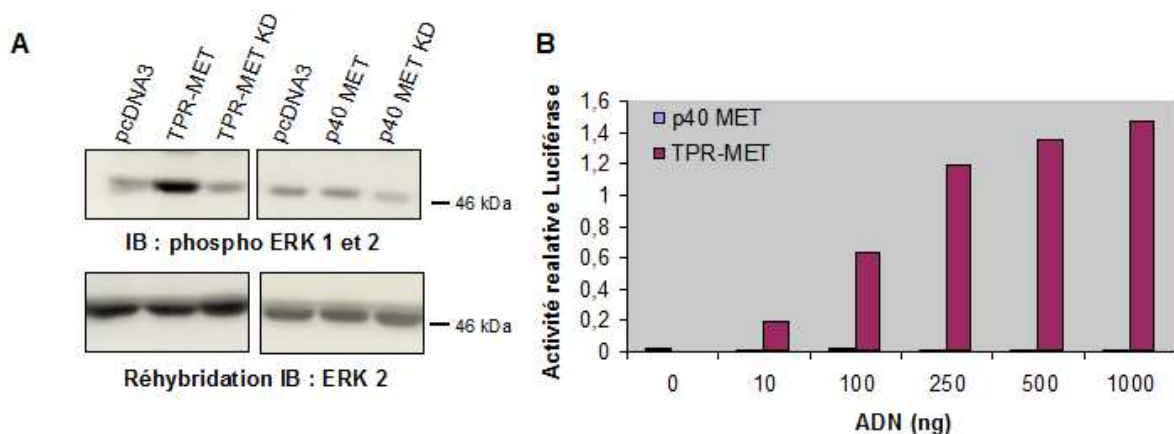
Alors que MET est un récepteur classiquement associé à la survie, le fragment p40 MET issu des clivages par les caspases est lui apoptotique. Puisque p40 MET KD est incapable d'induire l'apoptose, nous avons imaginé que les capacités apoptotiques de p40 MET sont la conséquence de son activité kinase, non régulée par son ligand l'HGF/SF. Cependant, la protéine de fusion TPR-MET est un fragment intracellulaire de MET constitutivement actif. Tout comme p40 MET, TPR-MET possède la partie intracellulaire de MET comprenant le domaine kinase (le site de clivage juxtamembranaire est distant de 8 acides aminés du site de fusion de TPR à MET). De plus, TPR-MET est cytoplasmique, non régulé par l'HGF/SF et son activité kinase est essentielle pour ses fonctions biologiques oncogéniques.

Après transfection transitoire de p40 MET et TPR-MET, nous avons réalisé un co-marquage de MET et de la caspase 3 activée, pour identifier, parmi les cellules transfectées, les cellules en apoptose (Figure 6 de la référence [385]). Nous avons ainsi montré que TPR-MET ne possède pas de capacités apoptotiques et que, par conséquent, l'expression d'un fragment comportant le domaine kinase de MET constitutivement actif ne conduit pas à l'apoptose.

Ainsi, nous avons montré qu'une forme constitutivement active et cytoplasmique de MET, TPR-MET, ne partage pas les capacités pro-apoptotiques de p40 MET.

### C. p40 MET n'est pas capable d'activer la voie Ras-MAPK ERK

Puisque p40 MET est phosphorylé et recrute des protéines de signalisation, nous avons testé sa capacité à activer la voie de signalisation Ras-ERK. En premier lieu, nous avons transfecté transitoirement p40 MET, p40 MET KD ainsi que TPR-MET, qui nous sert de témoin positif (Figure 30A). Ainsi, nous avons pu vérifier que TPR-MET induit la phosphorylation de la MAPkinase ERK, et que cette action nécessite son activité kinase. Dans la même expérience, la transfection de p40 MET ne permet pas la phosphorylation de ERK. De plus, nous avons réalisé un test de transactivation, plus quantitatif, pour vérifier l'activation de la voie Ras-MAPK. Pour ce faire, nous avons co-transfecté nos constructions avec un vecteur rapporteur possédant un gène luciférase sous le contrôle d'éléments de réponse à la voie Ras (Toru-Luc) (Figure 30B). Ces éléments de réponse à Ras sont constitués des sites de liaison pour les facteurs de transcription ETS et FOS/JUN, dont l'activité est régulée par les MAPKs ERK [115]. Nous montrons ainsi que TPR-MET induit une forte activité luciférase et est donc capable d'activer la voie Ras-ERK alors que p40 MET n'induit pas cette activité luciférase. Ainsi, malgré ses phosphorylations et recrutements, p40 MET n'est pas capable d'activer la voie de signalisation Ras-MAPK ERK, essentielle pour les réponses biologiques induites par MET.

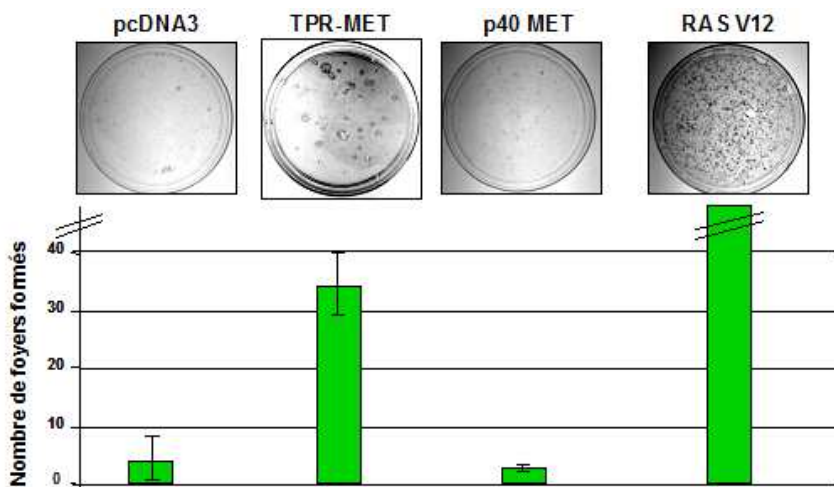


**Figure 30: Activation de la voie Ras-MAPK par TPR-MET et p40 MET.**

A- Des cellules MDCK ont été transfectées par pcDNA3, TPR-MET, TPR-MET KD, p40 MET ou p40 MET KD. Après lyse des cellules, les protéines ont été séparées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Les protéines et leurs formes phosphorylées ont été révélées avec les anticorps appropriés. B- Les tests de transactivation ont été réalisés en cotransfectant un vecteur rapporteur luciférase dépendant d'éléments de réponse à RAS et des doses croissantes de TPR-MET et p40 MET. L'activité luciférase est mesurée 48 heures plus tard.

#### **D. p40 MET n'a pas de capacité transformante**

La dérégulation de l'activité kinase est souvent associée aux capacités oncogéniques, comme tel est le cas pour TPR-MET. Puisque p40 MET présente une activité kinase active, nous avons testé ses capacités transformantes. Pour évaluer cette réponse, nous avons transfecté transitoirement p40 MET dans des fibroblastes NIH3T3 et réalisé un test de formation de foyers sur tapis confluent de fibroblastes (Figure 31). Par ce test, nous avons montré que p40 MET, contrairement à l'oncogène TPR-MET ou à la forme oncogénique de Ras (RasV12), ne possède pas de capacité transformante.



**Figure 31: Test de transformation.**

Les cellules transfectées par pcDNA3, TPR-MET, p40 MET ou RAS V12 sont cultivées en DMEM 10% CS puis en DMEM 5% CS lorsqu'elles sont confluentes. Au bout de 21 jours, les cellules sont fixées et colorées au cristal violet. Les valeurs rapportées représentent la moyenne du nombre de foyers formés sur 3 expériences (+/- Ecart Type).

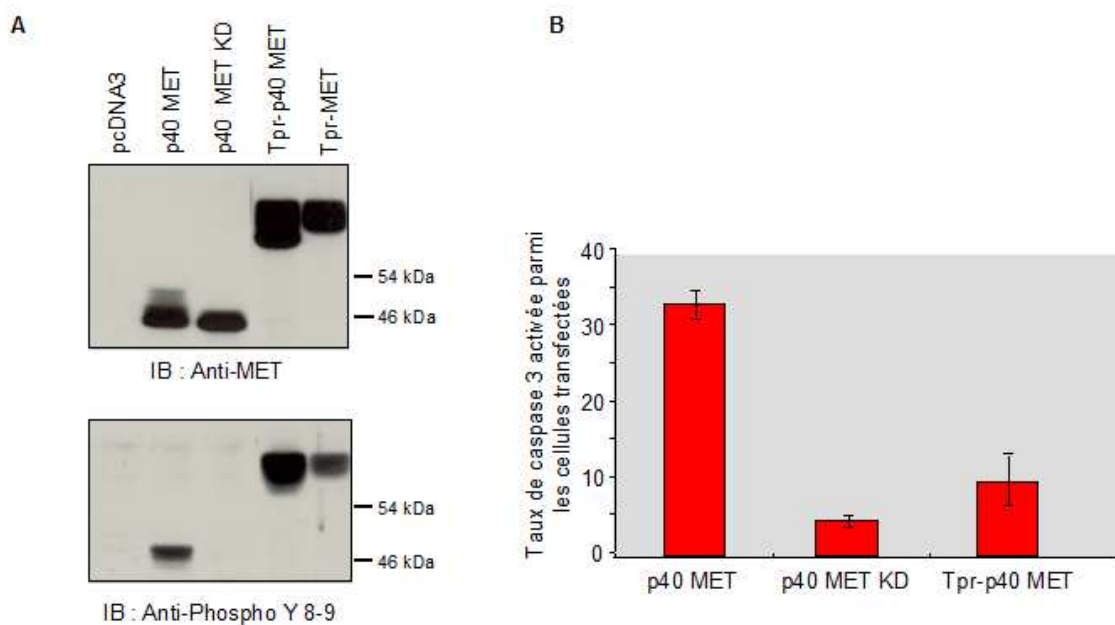
#### **E. Le domaine de dimérisation de TPR abolit les capacités apoptotiques de p40 MET**

Au fil de ces tests de réponses biologiques et de signalisation, il semble que les deux formes TPR-MET et p40 MET, malgré leurs similitudes, possèdent chacune leurs propres capacités. Cette différence pourrait résulter de la présence ou non du domaine de dimérisation de TPR. Par exemple, une étude démontre que la forte dimérisation apportée par TPR (Leucine Zipper dans TPR) potentialise l'activité tyrosine kinase de MET, ce qui pourrait orienter différemment les réponses biologiques [387]. Ainsi, pour évaluer si l'intensité de dimérisation est responsable des différences de fonctions biologiques observées entre p40 MET et TPR-MET, nous avons construit une forme TPR-p40 MET.



Cette construction est une fusion entre le domaine de dimérisation de TPR et la séquence de p40 MET. Après transfection transitoire en cellules MDCK, nous avons observé TPR-p40 MET à la taille attendue et clairement détecté avec un anticorps dirigé contre les tyrosines Y8 et Y9 phosphorylées (Figure 32A). Nous avons ensuite réalisé un test d'immunofluorescence afin de tester les capacités apoptotiques de TPR-p40 MET. Dans cette expérience, le taux d'activation de la caspase 3 dans les cellules transfectées par p40 MET se situe aux environs de 30 % alors qu'il est de 9 % dans celles transfectées par TPR-p40 MET, score proche de celui obtenu avec p40 MET KD (Figure 32B). Ainsi, tout comme p40 MET KD ou TPR-MET, TPR-p40 MET n'induit pas l'activation de la caspase 3 et ne possède donc pas de capacités apoptotiques.

L'ajout du domaine de dimérisation de TPR abolit donc les capacités pro-apoptotiques de p40 MET, suggérant qu'une dimérisation forte inhibe les capacités apoptotiques.



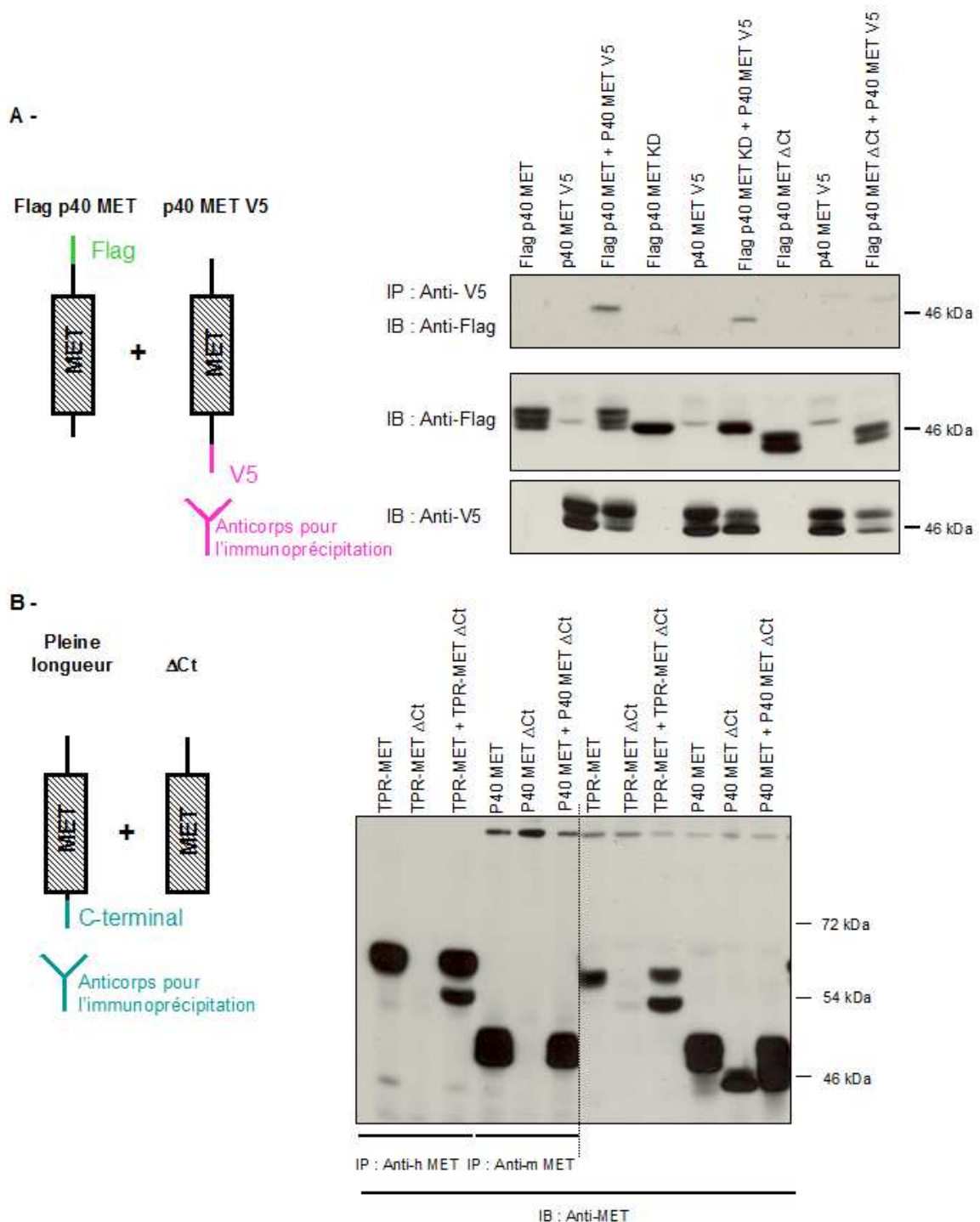
**Figure 32 : Comparaison de p40 MET, TPR-MET et TPR-p40 MET.**

A - Des cellules MDCK ont été transfectées par les vecteurs pcDNA3 exprimant p40 MET, p40 MET KD, TPR-p40 MET et TPR-MET. Après lyse des cellules, les extraits récupérés ont été séparés sur gel SDS-PAGE et transférés sur membrane PVDF. La membrane a été incubée avec les anticorps indiqués. B - Les cellules MDCK ont été transfectées transitoirement avec des vecteurs exprimant p40 MET, p40 MET KD ou TPR-p40 MET. 48h après transfection, les noyaux sont détectés avec le colorant Hoëchst et une immunofluorescence a été réalisée en utilisant des anticorps anti-MET et anti-caspase 3 active. Le pourcentage de caspase 3 active a été déterminé à partir d'au moins 200 cellules transfectées comptées par puits (n=3 ; +/- Ecart Type).

### ***F. p40 MET se dimérise via son domaine C-terminal***

Même si la dimérisation induite par TPR abolit les fonctions de p40 MET, p40 MET est phosphorylé et son activité kinase est nécessaire pour ses capacités apoptotiques, suggérant une étape de dimérisation. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons co-transfecté des formes de p40 MET étiquetées avec un épitope Flag ou V5 (Figure 33 A). Nous avons immunoprécipité les formes V5 avec un anticorps reconnaissant cet épitope puis réalisé un immunoblot avec un anticorps anti-Flag. Par cette technique de co-immunoprécipitation, nous montrons que p40 MET est capable de se dimériser, et ce indépendamment de son activité kinase puisqu'un p40 MET KD Flag s'associe à p40 MET V5. Par contre, la forme p40 MET délétée de sa région C-terminale (p40 MET  $\Delta$ Ct Flag), n'est pas co-immunoprécipitée avec p40 MET V5. Ainsi, ce résultat suggère que la dimérisation de p40 MET requiert son domaine C-terminal.

Pour appuyer ce résultat, nous avons comparé la dimérisation de p40 MET à celle de TPR-MET, qui implique le domaine de dimérisation de TPR. Pour ce faire, nous avons co-transfecté des formes sauvage et tronquée en C-terminal de p40 MET et TPR-MET (p40 MET  $\Delta$ Ct et TPR-MET  $\Delta$ Ct) (Figure 33 B). Nous avons immunoprécipité les formes pleine longueur avec un anticorps reconnaissant la région C-terminale de MET puis réalisé un immunoblot avec un anticorps reconnaissant le domaine kinase de MET. Lorsque nous immunoprécipitons TPR-MET, TPR-MET  $\Delta$ Ct est détecté montrant que TPR-MET se dimérise même sans domaine C-terminal. Par contre, l'immunoprécipitation de p40 MET ne permet pas de co-immunoprécipiter p40 MET  $\Delta$ Ct. Ce résultat confirme que contrairement à TPR-MET, p40 MET se dimérise *via* sa région C-terminale. Ainsi, p40 MET, bien que ne possédant pas de domaine de dimérisation fort, est capable de se dimériser.

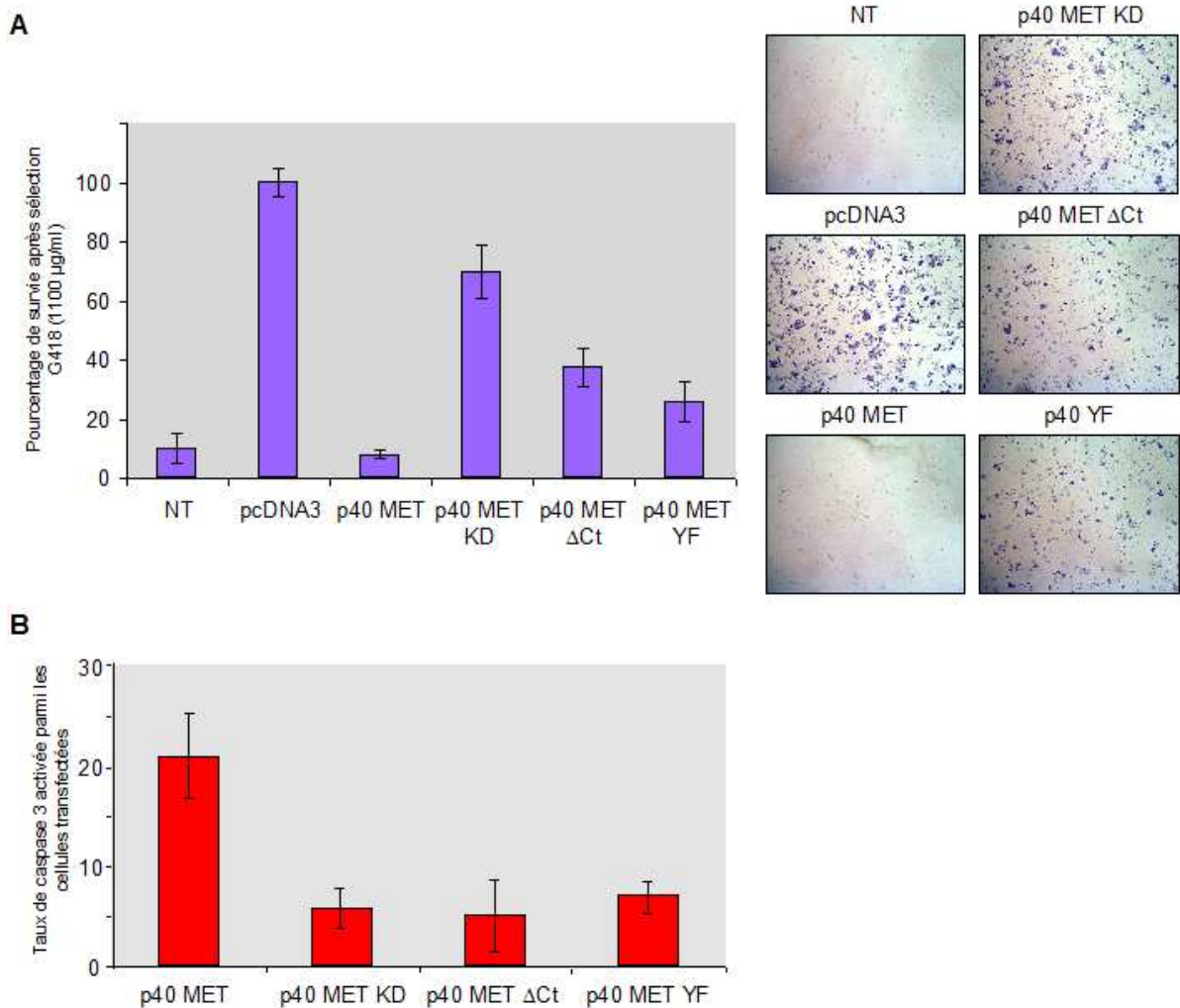


**Figure 33 : Dimérisation de p40 MET.**

A- Des cellules MDCK ont été transfectées par les vecteurs pcDNA3 exprimant Flag p40 MET, Flag p40 MET KD, Flag p40 MET ΔCt et/ou p40 MET V5. Après lyse des cellules, les extraits protéiques ont été incubés en présence de l'anticorps anti-V5 et précipités avec des billes de protéine A Sépharose. B- Des cellules NIH3T3 ont été transfectées par les vecteurs pcDNA3, TPR-MET et/ou TPR-MET ΔCt, p40 MET et/ou p40 MET ΔCt. Après lyse des cellules, les extraits protéiques ont été incubés en présence de l'anticorps anti-Cterminal de MET (souris ou humain) et précipités avec des billes de protéine A Sépharose. A,B- Les extraits récupérés ainsi que les extraits totaux ont été ensuite séparés sur gel SDS-PAGE et transférés sur membrane PVDF. La membrane a été incubée avec les anticorps indiqués.

### ***G. La capacité apoptotique de p40 MET requiert sa région C-terminale***

La région C-terminale étant importante pour la capacité de p40 MET à se dimériser, nous avons testé si cette région avait également un rôle dans sa réponse pro-apoptotique. Ainsi, en utilisant des mutants délétés de cette région (p40 MET $\Delta$ Ct ) ou mutés sur les tyrosines Y14 et Y15 (p40 MET YF), cruciales pour les réponses biologiques de MET, nous avons évalué l'importance de la région C-terminale de MET dans les capacités apoptotiques de p40 MET. Tout d'abord, nous avons réalisé un test de survie en HEK293 par un test de formation de colonies [385]. Nous avons transfecté transitoirement les vecteurs exprimant les différents mutants de p40 MET en HEK293, possédant tous un gène de résistance à la néomycine (ou G418). Dix jours après transfection et sélection, 70% des cellules transfectées par p40 MET KD survivent alors que ce taux chute à 10% pour les cellules transfectées par p40 MET (Figure 34A). Dans ce test, la délétion ou la mutation des tyrosines C-terminales de p40 MET diminue les capacités apoptotiques de p40 MET. En effet, entre 40 et 20% des cellules transfectées par p40 MET $\Delta$ Ct et p40 MET YF survivent. De même, dans un test d'activation de la caspase 3 en immunofluorescence, le niveau d'activation de la caspase 3 dans les cellules transfectées par p40 MET $\Delta$ Ct et p40 MET YF est identique à celui dans celles transfectées par p40 MET KD, indiquant que leur capacité apoptotique est inhibée (Figure 34B). Ainsi, la région C-terminale ainsi que les tyrosines Y14 et Y15 sont essentielles pour les réponses pro-apoptotiques de p40 MET.



**Figure 34 : Capacités apoptotiques de différents mutants de p40 MET.**

A - Les cellules HEK293, cultivées en plaque 6 puits, ont été transfectées, ou non (NT), avec un vecteur vide ou exprimant p40 MET, p40 MET KD, p40 MET $\Delta$ Ct et p40 MET YF. Deux jours après la transfection, les cellules ont été réparties dans 4 boîtes 100 mm. Les cellules ont été sélectionnées 10 jours avec du G418 (1100  $\mu$ g/ml) et comptées. Les résultats sont présentés comme le pourcentage de cellules survivant en prenant les cellules transfectées par pcDNA3 comme référence (n=3 ; +/- Ecart Type). Une boîte de chaque condition a été colorée et présentée. B - Les cellules MDCK ont été transfectées transitoirement avec des vecteurs exprimant p40 MET, p40 MET KD, p40 MET $\Delta$ Ct et p40 MET YF. 48h après transfection, les noyaux sont détectés avec le colorant Hoechst et une immunofluorescence a été réalisée en utilisant des anticorps anti-MET et anti-caspase 3 active. Le pourcentage de caspase 3 active a été déterminé à partir d'au moins 200 cellules transfectées comptées par puits (n=3 ; +/- Ecart Type)

Ainsi, cette étude nous a permis de montrer qu'en plus de nécessiter son activité kinase, les fonctions apoptotiques de p40 MET requièrent son domaine C-terminal. En effet, des formes de p40 MET sans activité tyrosine kinase ou sans domaine C-terminal ne sont pas fonctionnelles. Par ailleurs, le domaine C-terminal de p40 MET est aussi impliqué dans sa dimérisation, rapprochant les fonctions apoptotiques et de dimérisation de p40 MET. De manière intéressante, la dimérisation de p40 MET induite par un domaine de forte

dimérisation (TPR) abolit ses capacités apoptotiques. Ainsi, l'intensité de dimérisation pourrait orienter les capacités de MET vers la transformation ou l'apoptose. Cependant, plusieurs travaux sont encore à réaliser pour comprendre au mieux ce mécanisme.

## IV. Conclusion et discussion

Nous avons montré l'existence d'un nouveau clivage de MET par les caspases, en plus de celui juxtamembranaire déjà décrit [384]. Ce clivage a lieu au niveau d'un site consensus de type DXXD situé dans l'extrémité C-terminale de MET. Même s'il ne retire que quelques acides aminés, ce clivage a d'importantes conséquences fonctionnelles. Premièrement, ces clivages sont organisés de manière hiérarchique, celui en C-terminal favorisant celui en juxtamembranaire. Deuxièmement, la délétion de ces acides aminés augmente les capacités pro-apoptotiques de p40 MET. Troisièmement, des cellules exprimant stablement un récepteur MET muté sur le site caspase C-terminal génèrent moins de fragment p40 MET et sont plus résistantes à l'apoptose. Ainsi, ces résultats révèlent un clivage du récepteur MET par les caspases en deux étapes séquentielles réorientant ses activités biologiques de récepteur de survie vers une activité pro-apoptotique capable d'amplifier l'apoptose. Les expériences en clones inductibles confirment que le fragment p40 MET est donc plus un amplificateur plutôt qu'un inducteur d'apoptose.

L'activité apoptotique de p40 MET requiert son activité kinase. De plus, le domaine C-terminal de p40 MET est essentiel pour sa dimérisation mais aussi pour ses activités apoptotiques, suggérant un lien entre ces deux fonctions du domaine C-terminal. Par contre, si p40 MET se dimérise *via* son domaine C-terminal, sa forte dimérisation induite par l'ajout du domaine TPR de TPR-MET abolit ses capacités apoptotiques. Ainsi, il est possible que l'intensité de dimérisation joue un rôle clé dans l'orientation des fonctions biologiques de MET, ce qui expliquerait les divergences entre p40 MET et TPR-MET.

### **A. Des clivages bien organisés**

#### **1. Des seuils d'activation différents pour des clivages différents**

Une première explication de la séquentialité observée des clivages repose sur une sensibilité différente des deux sites pour une même caspase. Nous savons que la caspase 3 est capable de cliver MET en juxtamembranaire [384] et en C-terminal [385]. Ainsi, il se peut que le clivage en C-terminal nécessite une faible activation de caspase 3 et que celui en juxtamembranaire en nécessite une plus forte. Ceci expliquerait alors que le clivage C-terminal ait lieu avant le juxtamembranaire. D'ailleurs la protéine Ras-GAP, un régulateur des voies RAS et Rho, illustre bien cette hypothèse. En effet, une faible activation de la caspase 3 permet un premier clivage de RAS-GAP, ce qui génère un fragment anti-

apoptotique. Mais lorsque la caspase 3 est pleinement activée, un second clivage génère un autre fragment, cette fois pro-apoptotique [388, 389].

Cependant, il a été montré récemment au laboratoire que si la caspase 3 est effectivement capable de cliver *in vitro* au niveau des deux sites, elle ne semble réellement requise que pour le clivage juxtamembranaire. En effet, dans des cellules dépourvues de caspase 3, le clivage juxtamembranaire est totalement inhibé alors que celui en C-terminal a toujours lieu (résultats non publiés de Frédéric Ancot). Ainsi, ce nouveau résultat semble être en désaccord avec notre hypothèse de sensibilité.

## **2. Des caspases différentes pour des clivages différents**

Nous pouvons également supposer que cette séquentialité dans les clivages de MET soit due à une séquentialité dans l'activation des caspases : le premier clivage serait pris en charge par une caspase rapidement activée durant l'apoptose de type initiateur et le second par la caspase 3, qui est une caspase effectrice. En effet, même si la caspase 3 clive un grand nombre de substrats durant l'apoptose, d'autres caspases peuvent cliver spécifiquement certains substrats impliqués dans l'amplification de l'apoptose. Par exemple, le récepteur tyrosine kinase HER2 et l'adaptateur IRS-1 (Insuline Receptor Substrat) ne sont pas clivés par la caspase 3 mais par la caspase 8 et la caspase 10 respectivement [390, 391]. Ainsi, il est possible que MET soit clivé en C-terminal par une caspase toujours non identifiée. Cependant, il est difficile de prédire à partir des sites constituant les zones de clivages de MET, quelle caspase est impliquée. Par conséquent, la recherche de la caspase clivant en C-terminal passera par des expériences de clivages *in vitro* ou d'inhibitions systématiques des différentes caspases (travail de thèse de Frédéric Ancot).

## **3. Un site C-terminal muté rend muet le clivage juxtamembranaire**

Nous avons montré que la mutation du site C-terminal des caspases défavorise le clivage en juxtamembranaire et donc la génération de p40 MET. Cette expérience nous a permis de révéler l'organisation hiérarchique de ces clivages. Cependant, nous n'avons pas identifié le mécanisme expliquant que cette mutation en C-terminal a des conséquences en juxtamembranaire. Nous pouvons imaginer que la présence de l'extrémité C-terminale bloque l'accès au site caspase juxtamembranaire. Ainsi, le clivage C-terminal pourrait permettre un changement conformationnel favorisant le clivage juxtamembranaire. D'ailleurs il est intéressant de noter que ces clivages séquentiels ne sont observés que dans des expériences d'induction d'apoptose en cellules alors que dans des expériences de clivage *in vitro*, la mutation du site C-terminal n'a aucune conséquence sur la génération de fragment



p40 MET. Ceci pourrait s'expliquer par l'utilisation de caspases purifiées en excès dans ce type d'expériences, mais également par l'altération de la conformation de la protéine.

#### **4. Un clivage C-terminal pour une bonne cause**

Une conséquence directe de cette séquentialité des clivages caspases est que tous les fragments p40 MET générés sont dépourvus de l'extrémité C-terminale. Même si cette extrémité est très courte (5 acides aminés chez la souris et 13 chez l'humain), sa présence ou son absence sur p40 MET n'est pas sans conséquences. En effet, l'addition de cette extrémité C-terminale sur un fragment p40 MET décroît ses capacités apoptotiques [385]. Ce résultat suggère que ce domaine peut être un régulateur négatif, en tout cas des capacités apoptotiques de MET.

En effet, l'extrémité C-terminale libérée par le clivage de MET pourrait permettre la libération d'une région auto-inhibitrice, comme tel est le cas pour d'autres récepteurs tyrosine kinase. Pour Tie2 et RON, il est proposé que l'extrémité C-terminale interagisse avec le domaine catalytique kinase, empêchant alors l'accès de l'ATP au site actif [392, 393]. Dans le cas de Tie 2, la délétion de cette région (16 acides aminés) augmente l'activité kinase de la protéine et ses capacités anti-apoptotiques [394]. De manière intéressante, des études biochimiques ont suggéré un rôle de la queue C-terminale de MET dans la régulation de l'activité kinase. En effet, MET a été immunoprécipité à partir de cellules de mammifère, et l'addition d'un peptide mimant la partie C-terminale a inhibé son autophosphorylation, la phosphorylation de substrat et plusieurs réponses biologiques [395]. Cependant, nous avons montré que la phosphorylation d'un p40 MET et d'un p40 MET possédant l'extrémité C-terminale est identique, ce qui n'est pas en faveur d'une augmentation d'activité kinase en absence de l'extrémité C-terminale.

Si tous les p40 MET sont délétés de l'extrémité C-terminale, nous avons montré que durant le processus apoptotique, l'ensemble des récepteurs MET sont également clivés en C-terminal. Puisque le clivage C-terminal doit avoir lieu pour permettre la génération de p40 MET, il est possible que la rapidité et la totalité du clivage C-terminal sur le récepteur MET fournisse un pool de récepteurs directement clivables en juxtamembranaire, afin de générer du p40 MET et amplifier l'apoptose. En quelque sorte, ce premier clivage aurait pour rôle de préparer au mieux MET pour sa mission d'amplification d'apoptose. Cependant ces récepteurs tronqués pourraient avoir une toute autre vocation. En effet, cette forme est théoriquement encore capable de répondre à son ligand l'HGF/SF et on peut imaginer que la délétion de son extrémité C-terminale modifie les réponses induites par le récepteur. Ainsi, la comparaison, qui est en cours au laboratoire, d'une forme pleine longueur et d'une forme tronquée en C-terminal nous permettra de mieux comprendre le rôle de ce clivage C-terminal

(travail de thèse de Frédéric Ancot). Il sera par exemple intéressant d'évaluer le comportement de ces différentes formes lors de l'apoptose. Une hypothèse attractive est, par exemple, que ce clivage C-terminal élimine un domaine inhibiteur et rende MET plus sensible à son ligand. Ainsi, ce clivage C-terminal servirait de sonnette d'alarme à la moindre activation de caspases, générant une forme « super-active » pour contrecarrer l'apoptose en cours.

## ***B. p40 MET, un fragment apoptotique***

### **1. Capacités apoptotiques de p40 MET, juste une question d'intensité de dimérisation**

Lors de nos investigations sur p40 MET, un lien a été établi entre ses capacités apoptotiques et de dimérisation. En effet, nous avons montré que la région C-terminale de p40 MET est importante à la fois pour sa dimérisation et pour ses capacités apoptotiques. De plus, l'addition du domaine de dimérisation forte de TPR à p40 MET abolit ses capacités apoptotiques, mimant alors la forme TPR-MET. Ainsi, à partir de ces résultats, nous avons imaginé un modèle où une dimérisation de faible intensité induirait des fonctions apoptotiques tandis qu'une forte dimérisation induirait des fonctions de transformation. Ce n'est d'ailleurs pas la première fois que dimérisation et capacités apoptotiques sont liées. Par exemple, pour p75<sup>NTR</sup>, il a été montré qu'une forme monomérique possède des capacités apoptotiques alors que sa dimérisation les inhibe [396]. Les auteurs ont identifié dans p75<sup>NTR</sup> un nouveau type de domaine nommé AIDD (Apoptosis-inhibiting dimerization domain) qui est requis pour empêcher son effet pro-apoptotique lorsqu'il est dimérisé. D'ailleurs, comme p75<sup>NTR</sup>, plusieurs récepteurs à dépendance induisent l'apoptose en absence de ligand et donc sous forme monomérique mais pas en présence de leur ligand où leur dimérisation est induite.

### **2. Le domaine C-terminal au cœur de la signalisation**

Nous avons vu qu'un p40 MET délété de sa région C-terminale ou muté sur les tyrosines du site de recrutement présente des capacités apoptotiques réduites. Ainsi, les fonctions apoptotiques de p40 MET pourraient être initiées à partir de ce site multisubstrat, comme de nombreuses fonctions de MET. A l'heure actuelle, il n'y a pas de vraie piste pour expliquer l'effet pro-apoptotique de p40 MET. Néanmoins, nous savons qu'il est capable de recruter Grb2 et Gab1 par ces tyrosines C-terminales mais qu'il est incapable d'activer la voie Ras-ERK. Cela pourrait créer un déséquilibre au niveau de voies qui nécessitent des

régulations très fines dans leur activation. En effet, il a été montré que l'HGF/SF induit une phosphorylation rapide et soutenue de la MAPK ERK et une phosphorylation faible et rapidement réprimée de JNK. C'est la voie Ras-ERK qui contrôle l'inhibition de JNK *via* la phosphatase MKP2 [397]. Ainsi, si p40 MET ne peut pas activer ERK, il ne pourrait pas non plus réprimer JNK. P40 MET induirait une activation soutenue qui corrèlerait avec l'apoptose [397]. En effet, la voie JNK a été impliquée dans le processus apoptotique [398]. Notamment, la dynamique de la balance de l'activation des voies ERK et JNK est importante dans la détermination des réponses cellulaires, de survie ou d'apoptose [398]. Il sera donc intéressant d'évaluer l'activation de ces différentes voies de signalisation par p40 MET afin de déterminer si l'apoptose qu'il induit résulte de leur déséquilibre.

### 3. D'autres pistes pour p40 MET

En nous inspirant de modèles décrits dans la littérature, nous avons suivi différentes pistes afin de trouver les mécanismes mis en œuvre par p40 MET pour induire l'apoptose.

La première piste provient des récepteurs à dépendance qui, tout comme MET, peuvent avoir des fonctions anti- et pro-apoptotiques. Par exemple, il a été montré que le récepteur à dépendance DCC est capable de s'associer avec les caspases 3 et 9. L'absence de ligand favorise le recrutement de la caspase 9 qui contribuerait à l'activation de la caspase 3 dans le complexe, favorisant alors l'apoptose [233]. Pour autant, nous n'avons pas pu mettre en évidence jusqu'à maintenant le recrutement de caspases par p40 MET.

D'autre part, pour le récepteur UNC5H2, un autre récepteur à dépendance, il a récemment été montré qu'un domaine de mort, homologue à ceux de FAS, TNF-R ou p75<sup>NTR</sup>, est requis pour sa fonction apoptotique. En fait, ce domaine est responsable de l'interaction avec la « death-associated protein kinase » (DAP-kinase). La DAP-kinase est impliquée dans l'apoptose induite par de nombreux facteurs, et de la même façon, l'apoptose induite par UNCH5H2 nécessite l'activité de cette sérine/thréonine kinase [399]. Pour autant, la région intracellulaire de MET ne possède pas de domaine de mort. De plus, nous avons également testé la possibilité du recrutement par p40 MET de Dlk, un membre de la famille des DAPkinases, qui est capable d'interagir avec la forme inactive de TPR-MET [400]. Cependant, des expériences de co-immunoprécipitation entre p40 MET et Dlk, suite à leur transfection transitoire, n'ont pas permis de révéler d'interaction.

Une autre piste provient des fonctions pro-apoptotiques de l'HGF/SF parfois décrites. En effet, s'il est classiquement associé à la survie, l'HGF/SF induit une cytotoxicité et une mort cellulaire dans plusieurs types cellulaires [401]. Selon les types cellulaires, différents mécanismes responsables de la mort cellulaire induite par l'HGF/SF ont été évoqués. Par exemple, il a été montré que l'HGF/SF induit l'apoptose *via* la voie extrinsèque impliquant la

caspase 9, le clivage de BID et le relargage du cytochrome C. De plus, la PKC, l'induction de JNK1, la production de ROS et l'induction des MMP ont également été impliquées dans les effets pro-apoptotiques de l'HGF/SF. Nous pourrions tester ces différentes voies en supposant que les effets apoptotiques de p40 MET et de l'HGF/SF, dans certaines situations, impliquent les mêmes mécanismes.

Si sa fonction d'amplificateur d'apoptose est désormais bien établie, nous ne connaissons toujours pas les mécanismes mis en œuvre par p40 MET pour aboutir à cet effet. Il reste encore de nombreuses hypothèses à tester, ce qui sera probablement facilité par l'utilisation des inductibles de p40 MET (Travail de Master II de Jonathan Lefebvre).

### ***C. MET sur la voie des récepteurs à dépendance***

La fonction pro-apoptotique de MET en absence d'HGF/SF par son clivage caspase, qui contraste avec sa fonction anti-apoptotique en présence de ligand, est la caractéristique des récepteurs à dépendance. Ce mécanisme, comme nous l'avons vu en introduction, a des conséquences importantes dans la compréhension de processus biologiques comme le guidage des neurones par la nétrine 1 *via* le récepteur DCC [238].

L'enjeu du laboratoire est maintenant de découvrir les implications physiologiques des fonctions apoptotiques de MET. Il est donc envisagé d'investiguer les conséquences des fonctions pro-apoptotiques de MET dans un modèle murin par le remplacement du récepteur MET par un récepteur mutant non clivable par les caspases. Dans ces souris « knock-in », nous nous attendons à visualiser un défaut de mort cellulaire induit dans des conditions normales par MET *via* la formation de p40 MET, notamment durant des étapes particulières du développement où un état de dépendance serait créé par MET envers son ligand. Par exemple, l'HGF/SF et MET sont impliqués dans l'innervation des membres, MET étant exprimé par les motoneurones du tube neural et l'HGF/SF dans le bourgeon des membres. Il a été montré que l'expression complémentaire du récepteur et de son ligand est impliquée dans la survie et la guidance des motoneurones du tube neural au bourgeon des membres [34]. Durant ce processus, de nombreux motoneurones meurent par apoptose. Il a été proposé que l'HGF/SF participe à leur survie ce qui favoriserait leur adressage vers le bourgeon du membre. L'action anti-apoptotique de l'HGF/SF sur des motoneurones embryonnaires en culture corrèle avec cette hypothèse [35]. Dans cette situation, la propriété pro-apoptotique de MET pourrait amplifier la mort des cellules non stimulées par l'HGF/SF et créer une dépendance à l'HGF/SF. De façon similaire, l'HGF/SF et MET sont impliqués dans la formation des muscles squelettiques. L'HGF/SF, exprimé dans le bourgeon des membres, favorise la migration des myocytes précurseurs du dermomytome exprimant MET. Encore une fois, la réponse apoptotique de MET pourrait promouvoir la mort des cellules non ciblées

par l'HGF/SF. L'expression d'un mutant non clivable par les caspases dans les souris pourrait donc révéler de nouvelles fonctions du récepteur durant le développement.

#### ***D. Clivages caspases de MET et cancer***

Durant le processus de tumorigénèse, la balance survie/apoptose est importante. En effet, l'accumulation des cellules cancéreuses est le résultat d'une prolifération excessive et/ou d'une apoptose insuffisante [402, 403]. Ainsi, dans la plupart des cas, comme pour les stratégies thérapeutiques prenant MET et l'HGF/SF pour cible, les anti-cancéreux visent à inhiber leurs fonctions de prolifération et anti-apoptotique. Mais de plus en plus, plutôt que d'inhiber les voies de prolifération, les thérapies anti-cancéreuses cherchent à faciliter l'apoptose des cellules atteintes.

Pour illustrer cette idée, nous allons citer l'exemple de ErbB2. Par exemple, il a été montré que la présence de hauts niveaux d'ErbB2 est importante pour que les cellules tumorales soient sensibles à des drogues telles que la geldanamycine ou des anticorps tels que l'Herceptin [404, 405]. En effet, des traitements anti-cancéreux tels que la geldanamycine ou des anticorps tels que l'Herceptin induisent l'apoptose dans des cellules de cancer de sein surexprimant ErbB2 [406-408], ce qui provoque alors son clivage [404]. Le fragment de ErbB2 devient alors capable d'amplifier l'apoptose induite par les traitements. Seules les cellules exprimant assez de ErbB2 peuvent accumuler assez de fragment après traitement pour que ces fragments aient leur action pro-apoptotique. Ainsi, avec cette nouvelle fonction apoptotique après clivage caspase de MET, il est envisageable une stratégie similaire pour cibler MET. MET pourrait également, par la génération de p40 MET, sensibiliser les cellules cancéreuses à certains traitements.

#### ***E. Le récepteur tyrosine kinase MET, un agent double***

MET est un récepteur tyrosine kinase capable de contrecarrer l'apoptose en initiant des signaux de survie. Paradoxalement, nous l'avons vu, MET est également capable de promouvoir l'apoptose par la génération de p40 MET mais également en réponse à l'HGF/SF. Ainsi, il peut participer à double titre dans la régulation de la balance survie/apoptose, qui joue un rôle primordial durant le développement et la progression tumorale. L'étude des contextes et mécanismes reliés aux fonctions anti- ou pro-apoptotiques de MET ainsi que leurs conséquences physiologiques nous a permis d'écrire une revue mettant en valeur la dualité du récepteur MET.

Publication 2 (Revue):

Titre : **The shadow of death on the MET tyrosine kinase receptor.** [401]

## **I. Introduction**

Nous l'avons vu, le récepteur tyrosine kinase MET est clivé deux fois par les caspases pour générer un fragment biologiquement actif. Afin d'observer le plus de fragment possible, et nous permettre une meilleure manipulation de ce fragment, nous avons utilisé des inhibiteurs de protéasome. En effet, nous imaginions qu'une partie de p40 MET était dégradée par le protéasome et qu'en l'inhibant, nous obtiendrions de plus grandes quantités de ce fragment. En réalité, ces expériences, au lieu de nous permettre d'avancer sur le terrain des clivages caspases, nous ont dirigés vers d'autres chemins. En effet, l'inhibition du protéasome n'eut aucun effet sur la stabilisation du fragment p40 MET. Par contre, de manière intéressante, en présence de ces inhibiteurs, deux bandes distinctes de 55 et 50 kDa étaient détectées avec des anticorps dirigés contre MET. Par conséquent, forts de notre expérience sur les clivages de MET par les caspases et en nous aidant de la littérature, nous sommes partis sur la piste de nouveaux clivages du récepteur MET.

En étudiant de plus près ces deux fragments, nous avons découvert qu'ils étaient les produits d'une protéolyse régulée du récepteur. Ainsi, nous avons décortiqué les mécanismes générant ces fragments ainsi que les fonctions de MET associées à cette protéolyse.

## II. Résultats : Régulation de MET par les sécrétases

### A. Publication 3

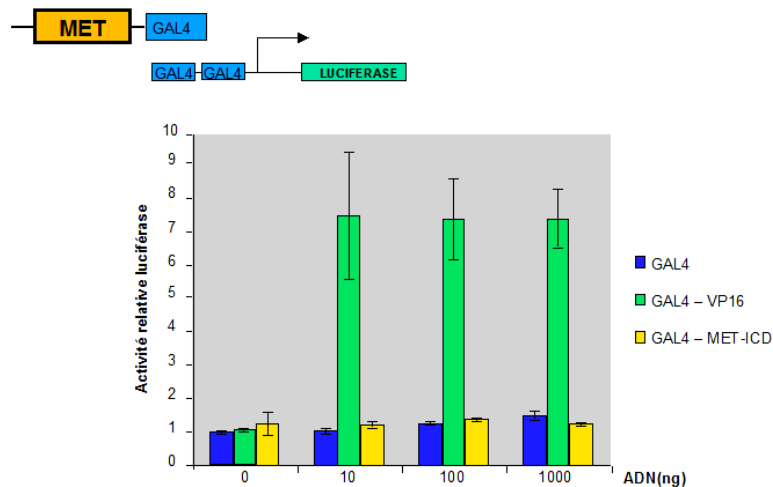
Titre :  $\gamma$ -secretase regulates MET receptor cleavage and HGF/SF-dependent transcriptional response

Dans cet article, nous avons montré que des inhibiteurs de protéasome stabilisent des fragments MET, détectés à environ 55 et 50 kDa, nommés respectivement MET-CTF (C-terminal Fragment ) et MET-ICD (Intracellular Domain) (Figure 1). La génération de ces fragments est augmentée avec un traitement aux esters de phorbol, le PMA, mais pas à l'HGF/SF. Le fragment MET-CTF provient d'un premier clivage de MET par les métalloprotéases, probablement l'ADAM17, dans le domaine extracellulaire de MET, ce qui génère par la même occasion un fragment soluble MET-NTF (N-terminal Fragment) (Figure 3). En utilisant des inhibiteurs de  $\gamma$ -sécrétase et des fibroblastes d'embryons de souris dépourvues de préséniline, nous avons démontré que MET-CTF est ensuite clivé par la  $\gamma$ -sécrétase pour générer MET-ICD (Figure 2). De plus, nous avons comparé la forme chimérique TRK-MET (domaine extracellulaire de TRK fusionné aux domaines transmembranaire et intracellulaire de MET) et TRK-METjuxta, où 50 acides aminés de la région juxta-extracellulaire ont été rajoutés. Cette comparaison nous a indiqué que la région extracellulaire de TRK ne permet pas un clivage par les métalloprotéases conduisant à celui par la  $\gamma$ -sécrétase, alors que l'addition du domaine juxtamembranaire de MET restaure le processus de protéolyse de MET (Figure 4). Ainsi, le clivage extracellulaire de MET est suffisant et nécessaire pour induire le clivage  $\gamma$ -sécrétase. Nous avons également démontré que le fragment MET-CTF est membranaire alors que MET-ICD est localisé à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Figure 5). Enfin, par des expériences d'immunoblot et de RT-PCR, nous avons montré que les activités métalloprotéase et  $\gamma$ -sécrétase sont nécessaires pour une expression efficace de c-Jun, un gène précoce, induite par l'HGF/SF (Figure 6). Pour autant, ces clivages ne semblent pas nécessaires à la phosphorylation de MET ou de la MAPK ERK en aval. Ces résultats suggèrent que le processus de PS-RIP de MET participe à la régulation de certains gènes cibles de l'HGF/SF.

## B. Résultats complémentaires

### 1. MET-ICD n'a pas de capacité transcriptionnelle intrinsèque

Ainsi, l'inhibition des clivages par les sécrétases empêche la transcription du gène c-Jun en réponse à l'HGF/SF. Ces résultats nous ont laissés imaginer que le fragment nucléaire MET-ICD est directement impliqué dans la transcription de ce gène. D'ailleurs, comme nous l'avons vu en introduction, de nombreux fragments issus de clivages  $\gamma$ -sécrétase sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle. Afin de tester si MET-ICD possède une activité transcriptionnelle, nous avons construit un vecteur exprimant MET-ICD fusionné en N-terminal à une séquence GAL4. Cette séquence est capable de se lier à l'ADN au niveau de son site spécifique de liaison. Ainsi nous interrogeons les capacités de transactivation de MET-ICD sur un vecteur rapporteur contenant des séquences GAL4 contrôlant un gène rapporteur luciférase. Dans ce test, nous avons utilisé un vecteur VP16-GAL4, contenant le domaine transactivateur de VP16 et les séquences de liaison à l'ADN de GAL4 comme témoin positif. Ce vecteur montre en effet une augmentation de la transactivation d'un facteur 8 par rapport au contrôle (Figure 35). Par contre, le MET-ICD GAL4 présente un niveau d'activation transcriptionnelle similaire à celui d'un vecteur contrôle qui contient uniquement la séquence GAL4. Ainsi, ces résultats montrent que MET-ICD n'est pas un transactivateur transcriptionnel. De même, en utilisant d'autres vecteurs rapporteurs présentant une importante activité basale, nous avons montré que MET-ICD n'est pas non plus un répresseur transcriptionnel (résultat non montré). Par ces expériences de transactivation, nous avons montré que MET-ICD ne possède pas de capacité intrinsèque de régulateur transcriptionnel.



**Figure 35 : Effet transcriptionnel de GAL4 MET-ICD.**

Des cellules MDCK ont été transfectées avec les vecteurs exprimant GAL4, GAL4 VP16 ou GAL4 MET-ICD ainsi que GAL4 luciférase. 24 h après, la mesure relative de l'activité luciférase a été mesurée au luminomètre.



## **2. Influence des clivages secrétases sur les effets biologiques du couple HGF/SF-MET**

Nous l'avons vu dans l'introduction, l'HGF/SF et MET sont impliqués dans de nombreuses réponses biologiques. Puisque les clivages de MET par PS-RIP semblent être impliqués dans la régulation transcriptionnelle induite par l'HGF/SF, nous avons cherché si ces clivages de MET jouaient également un rôle dans la réalisation des effets biologiques de l'HGF/SF. Ainsi, nous avons testé l'effet de l'inhibition des clivages par les métalloprotéases et la  $\gamma$ -secrétase sur les réponses de l'HGF/SF induites sur des cultures cellulaires, telles que la prolifération, la dispersion, la morphogenèse, la survie et la transformation.

### *a) Prolifération, Dispersion, Morphogenèse et survie*

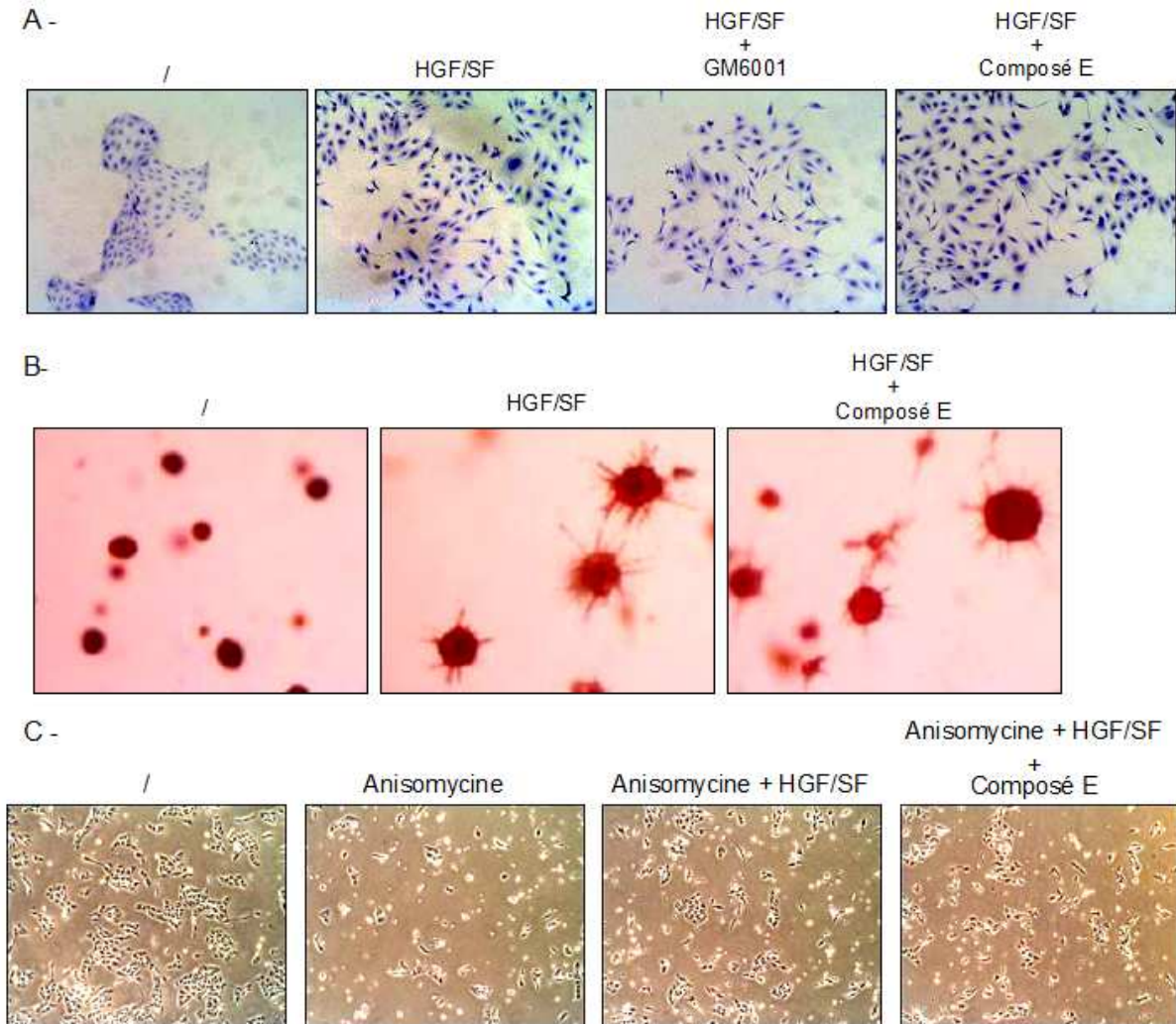
Dans un premier temps, nous avons évalué les capacités mitogènes de l'HGF/SF. Nous avons effectivement testé la capacité de l'HGF/SF à induire la prolifération des cellules HeLa (résultat non montré réalisé par Nicolas Houvenaghel). L'ajout des inhibiteurs des métalloprotéases (GM6001) ou de la  $\gamma$ -secrétase (Composé E) n'ont pas modifié la réponse de prolifération induite par l'HGF/SF.

Ensuite, nous avons testé la capacité de l'HGF/SF à induire la dispersion de cellules MDCK en îlot lorsque l'activité  $\gamma$ -secrétase ou métalloprotéase est inhibée. Nous avons ainsi pu montrer que ces inhibitions n'avaient aucun effet sur la dispersion induite par l'HGF/SF en MDCK (Figure 36A). Il est à noter que l'expérience a été reproduite dans d'autres types cellulaires tels que les HeLa, MDA-MB231 ou les DU145. Dans tous ces types cellulaires, les inhibiteurs de  $\gamma$ -secrétase ou métalloprotéase n'ont pas d'effet sur la réponse de dispersion induite par l'HGF/SF.

Nous avons testé l'aptitude de l'HGF/SF à induire la morphogenèse de branchement. Pour ce faire, nous avons réalisé un test de morphogenèse en gel de collagène. Dans ces conditions, les cellules MDCKensemencées forment des kystes et l'ajout d'HGF/SF conduit à la formation de tubes. Ainsi, nous avons pu montrer que l'inhibition des activités  $\gamma$ -secrétase ou métalloprotéase n'empêche pas les réponses de morphogenèse induites par l'HGF/SF sur les cellules MDCK (Figure 36B).

Nous l'avons vu, l'HGF/SF a un effet anti-apoptotique face à un stress. Nous avons donc induit l'apoptose dans des cellules MDCK en utilisant l'inducteur d'apoptose anisomycine. Si l'anisomycine induit effectivement la mort des cellules, le traitement préalable des cellules avec l'HGF/SF permet aux cellules de résister à l'apoptose. Ainsi, comme attendu, l'HGF/SF joue dans ces conditions son rôle anti-apoptotique. Encore une fois ici, l'inhibition de l'activité  $\gamma$ -secrétase n'a pas d'impact significatif sur la réponse de survie induite par l'HGF/SF (Figure 36C).

Nous avons ainsi pu montrer que les clivages de MET par les secrétases ne sont pas impliqués dans les réponses de prolifération, dispersion, morphogénèse et survie induites par l'HGF/SF.

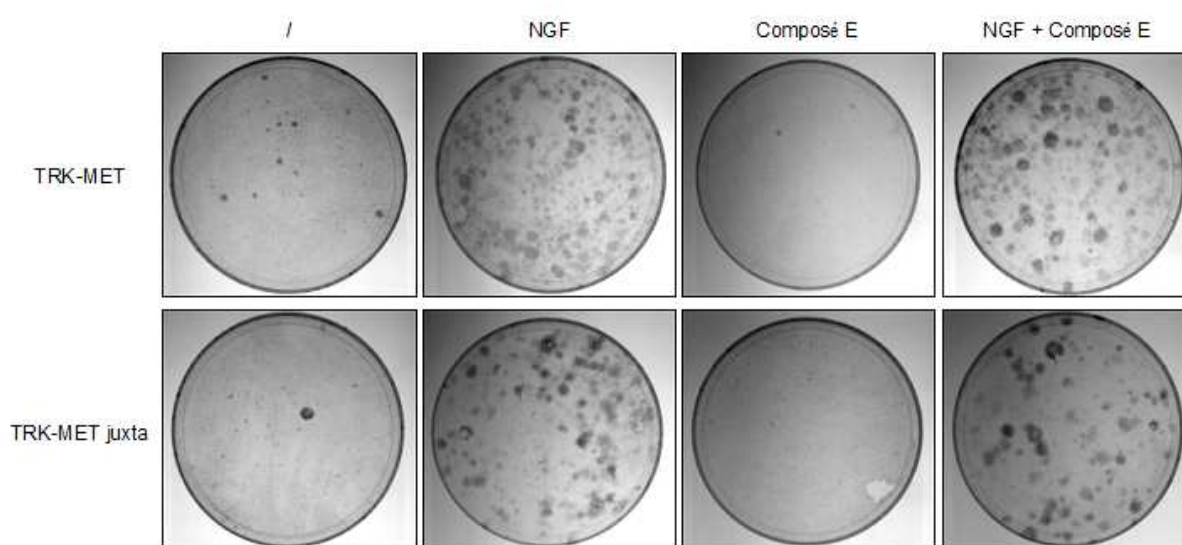


**Figure 36 : Tests biologiques.**

A – Test de dispersion : Les cellules MDCK ont étéensemencées à basse densité (2000 cellules/ml). Après 24h, les traitements de GM6001 (25 μM) et de Composé E (1 μM) sont ajoutés. Le lendemain, les îlots sont traités avec l'HGF/SF. Après 24 h, les cellules sont fixées et colorées au cristal violet/ethanol 70%. B – Test de morphogénèse. Les cellules (100000 cellules) ont étéensemencées dans des puits de collagène. Lorsque les cellules forment des kystes, l'HGF/SF et le Composé E sont ajoutés au milieu de culture. Après une dizaine de jours, l'expérience peut être arrêtée et colorée au rouge neutre. C – Test de survie : Les cellules ont étéensemencées (100000 cellules / ml) puis traitées avec les inhibiteurs de  $\gamma$ -secrétase. Après 24 h, les cellules sont traitées durant 8 h avec de l'anisomycine (50 μM) et de l'HGF/SF (10 ng/ml). Les photos ont été prises avec la caméra DP10 reliée au microscope optique.

### b) Transformation

Outre ces réponses biologiques physiologiques, nous avons vu que la suractivation de MET lui confert des capacités transformantes et oncogéniques. Un test pour évaluer ces capacités est le test de formation de foyers sur tapis confluent de fibroblastes. Ainsi nous avons réalisé ce test en transfectant en NIH3T3 des formes chimériques, décrites dans la publication 3, TRK-MET et TRK-METjuxta, sachant que TRK-MET ne subit pas les clivages secrétases de MET contrairement à TRK-METjuxta. Lorsque l'on stimule les cellules au NGF, TRK-MET et TRK-METjuxta induisent la formation de foyers sans qu'aucune différence significative n'ait pu être mise en évidence (Figure 37). Les clivages protéolytiques de MET ne modifient pas les capacités transformantes de MET en réponse à son ligand.



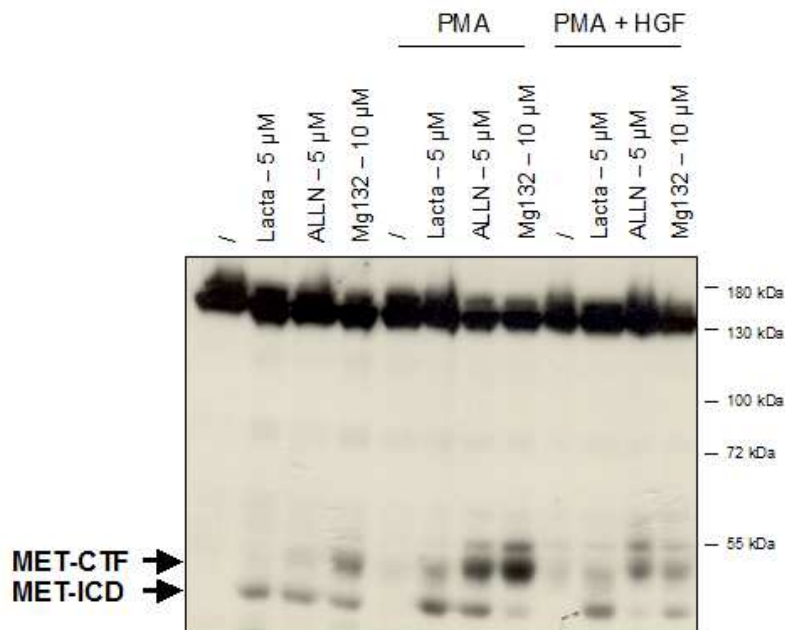
**Figure 37 : Test de transformation.**

Les cellules NIH3T3 transfectées par TRK-MET et TRK-METjuxta sont cultivées en DMEM 10% CS puis en DMEM 5% CS lorsqu'elles sont confluentes. Au bout de 48 h, les cellules sont traitées au NGF (100 ng/ml) et/ou au Composé E (1  $\mu$ M). Au bout de 21 jours, les cellules sont fixées et colorées au cristal violet.

### 3. Influence de l'HGF/SF sur les clivages secrétases de MET

Nous l'avons vu, les clivages secrétases de MET ont lieu de manière constitutive. En s'inspirant de la littérature et en se basant sur le rôle potentiel des clivages de MET dans la signalisation induite par l'HGF/SF, nous avons testé si l'HGF/SF lui-même est capable d'induire le clivage de son récepteur. Comme nous l'avons montré dans la publication 3, la stimulation à l'HGF/SF ne favorise pas la génération des fragments de MET. Par contre, nous avons également pu montrer que, comme nombre de substrats vus dans l'introduction, les clivages de MET par les secrétases sont induits pas les esters de phorbol tels que le PMA. C'est ainsi que nous avons voulu tester l'effet de la stimulation conjointe par l'HGF/SF

et le PMA sur les clivages de MET. Dans cette expérience, les cellules ont été traitées avec différents inhibiteurs de protéasome afin de stabiliser les deux fragments MET-CTF et MET-ICD. En condition de traitement au PMA, les fragments se sont accumulés par rapport aux conditions contrôles (Figure 38). Par contre, si l'on pré-traite les cellules avec de l'HGF/SF, le PMA ne semble plus avoir d'effet sur la génération des fragments. Ainsi, l'HGF/SF n'induit pas les clivages de MET mais inhibe l'induction des clivages par le PMA.



**Figure 38 : Effet de l'HGF/SF et du PMA sur les clivages de MET.**

Les cellules MDCK ont été traitées 5h avec de la Lactacystine et 10h avec du Mg132 et de l'ALLN. De plus, elles ont été stimulées 4h avec de l'HGF/SF et/ou 45 min avec du PMA. Pour chaque condition, la même quantité de protéines a été séparée sur un gel SDS-PAGE et analysée par Western Blot avec un anticorps dirigé contre le domaine kinase de MET.

### III. Conclusion et discussion

Nous avons démontré, par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et de fibroblastes d'embryons de souris génétiquement modifiées, que MET est d'abord coupé par une protéase de la famille ADAM dans son domaine extracellulaire. Ce clivage conduit à la libération d'un fragment soluble tronqué en C-terminal de 90 kDa (MET-NTF pour fragment N-terminal de MET) et la génération d'un fragment ancré à la membrane (MET-CTF pour fragment C-terminal de MET). Ce fragment est ensuite clivé par la  $\gamma$ -secrétase, ce qui conduit à la génération d'un fragment intracellulaire instable de 50 kDa (MET-ICD pour fragment intracellulaire de MET). En utilisant des constructions de MET possédant ou non la région juxtamembranaire, nous avons montré que le clivage extracellulaire est nécessaire et suffisant pour induire celui intramembranaire. De manière intéressante, en plus de sa localisation cytoplasmique attendue, le fragment MET-ICD est capable de transloquer dans le noyau, comme nous l'avons montré par l'utilisation d'inhibiteurs de l'export nucléaire. De plus, nous avons montré que l'inhibition des activités métalloprotéase et  $\gamma$ -secrétase empêche l'expression du gène c-Jun induite par l'HGF/SF, alors qu'elle n'empêche ni la phosphorylation de MET ni celle des MAPkinases ERK. Ainsi, la protéolyse de MET semble être impliquée dans les réponses transcriptionnelles de l'HGF/SF. Pour autant, MET-ICD ne possède pas d'activité transcriptionnelle intrinsèque. De plus, ces clivages ne semblent pas être impliqués dans les réponses de prolifération, de dispersion, de morphogenèse, de survie et de transformation de l'HGF/SF.

#### ***A. La PS-RIP de MET harmonise les fragments***

L'élagage extracellulaire de MET avait déjà été décrit dans la littérature. Les premiers travaux ont porté sur les formes solubles de MET libérées par processus protéolytique [70, 189]. Cet élagage extracellulaire de MET a été observé dans différents types cellulaires et induits par différents agents tels que le PMA [189], la suramine [409], l'EGF et le LPA [410] et même l'HGF/SF [411]. Par ailleurs, d'autres fragments ont été observés tels qu'un fragment labile à la localisation nucléaire ou un fragment membranaire phosphorylé pris en charge par le protéasome [190, 412]. Ainsi, notre travail suggère que toutes ces observations font références aux différents fragments générés par la PS-RIP du récepteur que nous avons révélée.

## ***B. La caractérisation des clivages sécrétases***

### **1. La famille ADAM sévit**

Comme nous l'avons vu dans la Publication 3, il semble que la métalloprotéase responsable du clivage extracellulaire de MET est l'ADAM17. En effet, des inhibiteurs pharmacologiques tels que le GM6001 ou le TAPI (TNF $\alpha$  proteinase inhibitor) empêchent le clivage de MET mais n'apportent aucune information précise puisque ce sont des inhibiteurs à large spectre. Par contre, d'autres inhibiteurs sont plus spécifiques. En effet, le composé GI254023X est rapporté comme un inhibiteur sélectif de l'ADAM10 alors que le GW280264X est plutôt inhibiteur de l'ADAM17 [413]. Ainsi, dans la publication 3, l'utilisation de ces différents inhibiteurs nous permet de placer l'ADAM 17 comme suspect numéro 1 pour le clivage de MET. Cependant, la plupart des études sur les inhibiteurs n'ont considéré que l'ADAM10 et l'ADAM17, les protéases majoritairement impliquées dans le PS-RIP, et il n'existe pas d'étude de comparaison d'efficacité de différents inhibiteurs sur un panel plus large d'ADAM, rendant les conclusions basées sur des inhibiteurs pharmacologiques incertaines.

Par ailleurs, dans les études déjà réalisées sur l'élagage extracellulaire de MET, il a été montré que la métalloprotéase clivant MET est spécifiquement inhibée par TIMP-3 et pas par TIMP-1 et TIMP-2 [410]. Or il apparaît que les profils d'inhibition des TIMP sont différents. En effet, TIMP-1 inhibe l'ADAM10, TIMP-2 inhibe l'ADAM-17 et TIMP-3 inhibe les ADAM 10, 12, 17, 28 et 33 [256]. Ainsi, ces résultats ne semblent en faveur de l'ADAM17, contrairement à ce que nos résultats laissent présager. Cependant, il est à noter que contrairement à notre étude, TIMP-3 inhibe le clivage de MET induit par l'EGF ou le LPA, et non celui constitutif. Il est donc possible que, selon les conditions dans lesquelles le clivage a lieu, les protéases impliquées soient différentes [256]. Par exemple, il a été démontré que le clivage constitutif de la protéine L1 est médié par l'ADAM10 alors que celui induit par les esters de phorbol ou la déplétion en cholestérol implique l'ADAM17 [274]. Il se pourrait qu'il en soit ainsi pour MET.

Afin d'identifier l'ADAM impliquée dans le clivage de MET, nous envisageons plusieurs stratégies plus discriminantes que les inhibiteurs pharmacologiques. En effet, nous disposons de plasmides codant les différentes ADAM et nous allons donc pouvoir surexprimer chaque ADAM puis en évaluer les conséquences sur le clivage de MET. En parallèle, nous utiliserons des fibroblastes issus de souris déficientes en ADAM où nous transfecterons un vecteur exprimant MET. Ainsi, nous verrons quelle(s) ADAM(s) est (sont) nécessaire(s) pour permettre l'élagage du récepteur (travail en collaboration avec Karina Reiss et Paul Saftig, Kiel, Allemagne). De plus, puisque nous suspectons l'ADAM17, nous

avons utilisé des siRNA dirigés contre cette ADAM. Après avoir vérifié l'efficacité d'extinction de ces siRNA, nous allons en évaluer les conséquences sur la PS-RIP de MET.

## **2. Stimuli pour déclencher la PS-RIP**

Puisque le clivage  $\gamma$ -secrétase de MET suit immédiatement l'élagage extracellulaire, la régulation de la PS-RIP a probablement lieu au niveau de cette étape d'élagage. Déjà, de nombreux stimuli ont été décrits pour moduler les élagages de différentes protéines [256]. De plus, selon les études sur l'élagage de MET, il a été montré que le clivage de MET est induit par : le TPA (tetradecanoylphorbol myristate acetate) *via* la PKC [70, 190], la suramine, un agent pharmacologique inhibant l'activité de facteurs de croissance [409], l'EGF et le LPA (lysophosphatidic acid) *via* la voie MAPK/ERK, l'HGF/SF [411] ou un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire de MET (DN30) [414].

Pour notre part, nous avons pu montrer que cette protéolyse survient de manière constitutive et qu'un traitement au PMA peut la stimuler davantage. Par contre, il semble que, dans nos modèles cellulaires, la stimulation de MET par son ligand l'HGF/SF n'induit pas la PS-RIP de MET, comme c'est le cas pour Notch et ErbB4 par exemple. En effet, nous avons montré qu'une stimulation à l'HGF/SF n'augmente pas le taux de récepteur MET clivé et qu'au contraire, un pré-traitement à l'HGF/SF empêche la stimulation du clivage par le PMA. Ainsi, si l'HGF/SF n'inhibe pas le clivage constitutif, il semble qu'il empêche la possibilité de stimuler ce clivage. Cette observation avait déjà été faite dans le cas du récepteur à l'hormone de croissance [415]. En effet, il a été montré que l'hormone de croissance (GH pour Growth Hormone) inhibe la protéolyse de son récepteur GHR (Growth Hormone Receptor) induite par le PMA par la dimérisation de ce récepteur. Dans ce cas, il a été montré que l'élagage de la partie extracellulaire de GHR participe à la diminution de son abondance à la surface cellulaire et par là même, à la diminution de la signalisation médiée par la GH [416-418]. Ainsi, la GH serait capable d'induire une signalisation efficace en protégeant son récepteur de la protéolyse. Au vu de nos résultats, nous pourrions imaginer le même mécanisme pour MET et l'HGF/SF

## **3. Les sites de clivage**

Grâce au poids moléculaire des différents fragments MET-CTF et MET-ICD, nous avons pu estimer les sites de clivage dans la région juxtamembranaire extracellulaire pour la génération de MET-CTF et aux environs du domaine transmembranaire pour MET-ICD. Pour autant, nous n'avons pas encore identifié les sites exacts de coupure. En effet, il n'existe pas de séquence consensus (comme pour les caspases) permettant d'identifier avec certitude le point de rupture. La caractérisation de ces fragments, incluant l'identification des sites de

clivage, est importante pour l'élaboration d'outils utiles à la mise en place d'études fonctionnelles, tels des mutants non clivables ou des fragments reconstituant MET-CTF et MET-ICD. Certaines études ont utilisé des ICD de APP prédits d'après la taille des fragments A $\beta$  (57-59 AA). Cependant, les ICD de APP qui ont été isolés plus tard à partir de cellules surexprimant APP étaient en réalité plus courts (49-50 AA) [363]. L'addition ou l'élimination involontaire des acides aminés N-terminaux pourrait affecter leur activité ou encore leur stabilité.

Afin d'identifier les sites de clivage de MET, nous établirons une stratégie biochimique qui a déjà fait ses preuves. Nous procéderons à une immunoprécipitation des différents fragments que nous analyserons en spectrométrie de masse afin de déterminer la masse exacte des fragments. Une autre technique serait de séquencer les fragments récupérés par microséquençage d'Edman. Cependant, cette technique présente l'inconvénient de nécessiter une importante quantité de fragments immunoprécipités, rendant cette technique moins accessible.

### ***C. Activation transcriptionnelle : une fonction potentielle pour MET-ICD***

Nous avons montré que l'HGF/SF induit l'expression du gène *c-jun* et que cette induction d'expression est abolie lorsque l'on inhibe les activités des métalloprotéases et des présénilines (Figure 6, Publication 3). Ces résultats suggèrent que le fragment MET-ICD obtenu par clivage joue un rôle dans la transcription. Cette hypothèse est cohérente avec les nombreux exemples de fragments issus de clivage  $\gamma$ -secrétase qui possèdent un rôle transcriptionnel. Parmi eux, nous pouvons citer APP, Notch, ErbB4 ou encore CD44.

De plus, la localisation nucléaire de MET-ICD conforte cette hypothèse. Pour autant, jusqu'à présent, nous n'avons pas identifié dans la séquence de MET un NLS (Nuclear Localization Signal) ou un NES (Nuclear Export Signal). Cependant, de nombreuses protéines transmembranaires de type 1 ont un signal particulier situé du côté cytosolique du domaine transmembranaire et composé d'une courte séquence de résidus Arg/Lys. Ces acides aminés peuvent fonctionner comme un NLS après clivage  $\gamma$ -secrétase ou caspase. Puisque la région juxtamembranaire de MET possède ce type de séquence, il est envisageable qu'elle permette aux fragments intracellulaires d'aller dans le noyau.

Cependant, de nombreux points restent à éclaircir pour étayer l'hypothèse du rôle transcriptionnel de MET-ICD. En effet, elle n'est pour l'instant basée que sur des expériences utilisant différents inhibiteurs pharmacologiques. Une première étape serait d'inhiber autrement les clivages, par exemple avec les siRNA de l'ADAM17, si l'ADAM17 est effectivement reconnue comme la protéase responsable du clivage de MET. Ensuite, pour montrer un rôle direct des clivages de MET dans la transcription de c-Jun par l'HGF/SF,



plusieurs expériences sont à réaliser. En effet, nous envisageons d'effectuer des tests de transactivation sur un vecteur rapporteur contenant le gène luciférase sous le contrôle du promoteur de c-Jun. Ce test nous permettra d'évaluer s'il s'agit bien d'une réponse transcriptionnelle. De plus, afin de tester directement le rôle des clivages de MET, nous reconstituerons le fragment MET-ICD, dès que les sites de clivage auront été identifiés, et nous testerons son activité transcriptionnelle.

Puisque les clivages de MET semblent être impliqués dans l'expression de c-Jun induite par l'HGF/SF, nous avons également évalué leur impact sur d'autres gènes cibles de l'HGF/SF. En effet, nous l'avons vu en introduction, l'HGF/SF induit l'expression de nombreux gènes cibles aux fonctions différentes. Nous avons dans un premier temps investigué les gènes cibles de la même famille de c-Jun, tels que junB et fos. Par les mêmes techniques utilisées pour c-Jun, nous n'avons pas obtenu d'effet des clivages sur leur expression. De plus, en élargissant les tests aux différentes familles de gènes cibles identifiés de l'HGF/SF, nous n'avons pas, pour l'instant, identifié d'autres expressions de gènes cibles qui dépendraient des clivages sécrétases de MET. Pour autant, le champ d'investigation reste encore très large avant de conclure qu'il s'agisse d'un effet spécifique à c-Jun.

Les expériences réalisées avec GAL4 MET-ICD semblent indiquer que ce fragment ne possède pas d'activité transcriptionnelle propre. Cependant, il est possible que son action soit indirecte. En effet, comme nous l'avons vu en introduction, les fragments issus de  $\gamma$ -sécrétase peuvent être impliqués dans la transcription de différentes façons. Par exemple, il a été montré que l'activité transcriptionnelle médiée par CD44 est induite par l'interaction de CD44-ICD avec le coactivateur transcriptionnel CBP/p300 [419]. D'autre part, l'export nucléaire de CBP par le fragment issu du clivage  $\gamma$ -sécrétase de la N-cadhérine favorise sa dégradation par le protéasome, suggérant que l'instabilité des fragments ICD puisse être impliquée dans la régulation transcriptionnelle [420]. Il est donc possible d'imaginer les mêmes types de mécanismes pour expliquer comment MET-ICD régule la transcription de c-Jun.

Puisque le clivage de MET semble réguler l'expression de c-Jun en réponse à l'HGF/SF, il est envisageable que ces clivages régulent également des réponses biologiques. En effet, nous l'avons vu en introduction, l'expression de gènes cibles en réponse à l'HGF/SF contribue très souvent à la mise en place d'une réponse biologique. Cependant, nos résultats ne valident pas cette hypothèse. En effet, nous avons donc testé un large panel de réponses biologiques dans lesquelles le clivage de MET pourrait être impliqué. Nous avons réalisé des tests de prolifération, dispersion, morphogenèse, survie et transformation, et ce dans différents modèles cellulaires. Dans les quatre types cellulaires testés (MDCK, HeLa, Du-145 et MDA-MB21), les inhibiteurs de sécrétase n'ont pas eu d'influence sur les effets biologiques du couple HGF/SF-MET. Pour autant, au vu de l'ampleur des réponses médiées

par le couple HGF/SF-MET, et ce dans divers types cellulaires, il n'est pas exclu que les clivages secrétases de MET aient, malgré tout, une réelle implication dans ses fonctions biologiques.

#### ***D. Régulateurs fonctionnels ou produits de dégradation, entre les deux MET-ICD balance***

Lors du PS-RIP de MET, le premier clivage donne lieu à la production d'un fragment C-terminal MET-CTF. Ce fragment semble stable mais il est immédiatement pris en charge par la  $\gamma$ -secrétase. En effet, la simple inhibition de la préséniline suffit à accumuler une grande quantité de ce fragment. Par contre, le fragment MET-ICD est lui très labile. Il est impossible de le détecter sans inhiber préalablement le protéasome. Cette grande instabilité de MET-ICD peut suggérer que la vocation des clivages  $\gamma$ -secrétase est de dégrader le récepteur MET par la génération de fragments instables.

De manière intéressante, nos résultats préliminaires montrent que l'inhibition pharmacologique des métalloprotéases dans divers types cellulaires engendre une accumulation de récepteur pleine longueur (résultats non montrés). Il se peut donc que les clivages permettent une dégradation du récepteur indépendamment du ligand, la génération de ces fragments n'impliquant pas la stimulation par l'HGF/SF. Pour appuyer ces résultats, nous comparerons la demi-vie des formes sauvage et mutante (non-clivable) du récepteur, qui lui serait moins dégradé.

Dans l'introduction, nous avons déjà vu le mécanisme de dégradation du récepteur MET suite à son activation par l'HGF/SF. La phosphorylation de MET sur sa tyrosine Y2 permet le recrutement de l'E3 ligase Cbl conduisant à son ubiquitination et sa dégradation. Il sera donc intéressant de savoir si cette dégradation possède des similitudes avec la dégradation dépendant du ligand. Par exemple, nous vérifierons si cette dégradation implique la phosphorylation de la Y2, le recrutement de Cbl et l'ubiquitinylation. Nous nous intéresserons également au lien entre clivage secrétase de MET et endocytose. En effet, différentes preuves suggèrent que les endosomes précoces ou dits de recyclage pourraient être un compartiment majeur pour le clivage de APP, Notch ou p75<sup>NTR</sup> [421-423]. D'ailleurs, il a été observé que les complexes actifs  $\gamma$ -secrétases sont enrichis dans les membranes des lysosomes [424]. De plus, un nouveau modèle a été proposé où la monoubiquitination et l'endocytose de Notch sont des pré-requis pour son clivage par la  $\gamma$ -secrétase [422]. Cette ubiquitination a lieu sur un résidu lysine de la région juxtamembranaire qui est assez conservé dans différents substrats de la  $\gamma$ -secrétase, laissant imaginer que ce processus puisse être un mécanisme général pour les clivages PS-RIP.

Si plusieurs fragments issus de la PS-RIP ont été décrits pour être impliqués dans une signalisation nucléaire, ils ne le sont pas tous. Ainsi, l'hypothèse que certains fragments de clivages de  $\gamma$ -secrétase sont des molécules de signalisation mais que d'autres ne peuvent être que des intermédiaires de dégradation a déjà fait l'objet d'une revue [306]. De plus, l'auteur présente des analogies entre le complexe  $\gamma$ -secrétase et le protéasome. Par exemple, comme le protéasome, la  $\gamma$ -secrétase est un complexe multiprotéique composé d'éléments dont une sous-unité catalytique. De manière analogue à la conjugaison de l'ubiquitine qui prépare les protéines cibles à la dégradation protéosomale, l'élagage extracellulaire prépare les substrats membranaires au clivage par la  $\gamma$ -secrétase. De plus, le protéasome n'induit pas toujours la dégradation complète de ses substrats mais peut aussi protéolyser un substrat polyubiquitinylé pour produire des peptides biologiquement actifs. Ainsi, l'auteur compare le complexe  $\gamma$ -secrétase à un protéasome de membrane [306]. Ainsi, si le mécanisme de dégradation de MET dépendant de l'HGF/SF est bien connu, les clivages secrétase pourraient représenter une toute autre voie de dégradation indépendante du ligand. Par exemple, ce mécanisme de clivage pourrait servir à réguler de manière basale l'expression de récepteurs MET à la surface membranaire.

### ***E. Clivages $\gamma$ -secrétase de MET, une nouvelle ouverture pour le cancer***

Le couple HGF/SF-MET, par ses multiples activités, est associé à la progression tumorale lors de la dérégulation de sa signalisation. Il est donc envisageable que les clivages secrétases de MET, et chaque fragment produit, puissent également intervenir dans ces dysfonctionnements liés aux cancers.

Déjà, certaines études ont permis la quantification des fragments issus de l'élagage de MET, notamment le fragment soluble MET-NTF. Ainsi, en comparant différents modèles cellulaires cancéreux de sein ou de la prostate, les auteurs ont établi une corrélation directe entre l'élagage extracellulaire de MET et le caractère transformé des cellules [425]. Par ailleurs, il a déjà été montré qu'un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire de MET, nommé DN30, utilisé comme anti-cancéreux, induit la dégradation de MET et la libération d'un fragment soluble correspondant au domaine extracellulaire [414]. Ainsi, il a été proposé que cet anticorps inhibe la signalisation de MET non seulement en bloquant directement le récepteur mais également en générant un fragment extracellulaire soluble, lui-même capable d'agir comme dominant négatif.

La contre-partie membranaire de l'élagage MET-CTF pourrait également être impliquée de manière directe dans la transformation. En effet, nous avons montré que le fragment MET-CTF issu du clivage de la forme TRK-MET<sub>juxta</sub> est phosphorylé (résultat non montré). Il se pourrait que MET-CTF agisse comme le fragment C-terminal de HER2, phosphorylé et aux

capacités tumorigéniques, cité dans l'introduction [290, 291]. La découverte de ce fragment a permis de révéler un nouveau mécanisme expliquant l'action anti-tumorale de l'herceptin, un anticorps anti-HER2. En effet, en plus de bloquer la signalisation dépendant de HER2, cet anticorps peut également inhiber le clivage de HER2, empêchant alors la génération d'un fragment membranaire constitutivement actif et transformant.

Dans d'autres cas, le clivage  $\gamma$ -secrétase, dans d'autres cas que MET, a également été associé au cancer. Par exemple, la surexpression des ICD de Notch peut rendre certaines cellules épithéliales résistantes à l'arrêt de croissance [426]. De plus, dans certains cancers, différents mécanismes conduisent à l'activation constitutive de Notch et résultent dans une production accrue de NICD. La  $\gamma$ -secrétase étant un acteur clé dans la signalisation de Notch, il a été proposé que l'inhibition de cette protéase puisse représenter une nouvelle stratégie thérapeutique [427].

De manière intéressante, nous avons détecté les fragments MET-CTF et MET-ICD en abondance dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, les HeLa, DU-145 et les MDA-MB231. Dans la littérature, les formes tronquées ont beaucoup été étudiées dans la lignée cellulaire GTL-16 de carcinome gastrique, où le gène MET est amplifié et surexprimé [70, 189]. Il serait judicieux de comparer de manière quantitative dans des lignées normales et cancéreuses la génération des fragments.

## DISCUSSION GENERALE

### Diviser pour mieux régner

Le récepteur tyrosine kinase MET activé par son ligand, l'HGF/SF, induit la prolifération, la dispersion, la survie et la morphogenèse de cellules épithéliales. De manière classique pour un récepteur tyrosine kinase, la liaison de l'HGF/SF stimule la dimérisation et l'autophosphorylation de MET, ce qui déclenche l'activation en cascade de différentes voies de signalisation.

Cependant, durant ma thèse, nous avons montré que d'autres mécanismes interviennent pour la mise en place des réponses biologiques de MET. En effet, nous avons pu montrer que MET est le substrat de différentes protéolyse aboutissant à la génération de fragments originaux et fonctionnels. En effet, MET subit deux processus de protéolyse : un dépendant des métalloprotéase et du complexe  $\gamma$ -secrétase et un dépendant des caspases (Figure 39). MET est la cible d'une métalloprotéase qui génère un fragment soluble MET-NTF et un fragment membranaire MET-CTF. Ce dernier est immédiatement clivé par la  $\gamma$ -secrétase au niveau de sa région transmembranaire pour libérer un fragment intracellulaire MET-ICD. D'autre part, MET est la cible des caspases en conditions de stress. MET est alors clivé dans sa région C-terminale, générant un récepteur MET tronqué, qui peut être ensuite clivé dans sa région juxtamembranaire pour générer un fragment intracellulaire p40 MET.

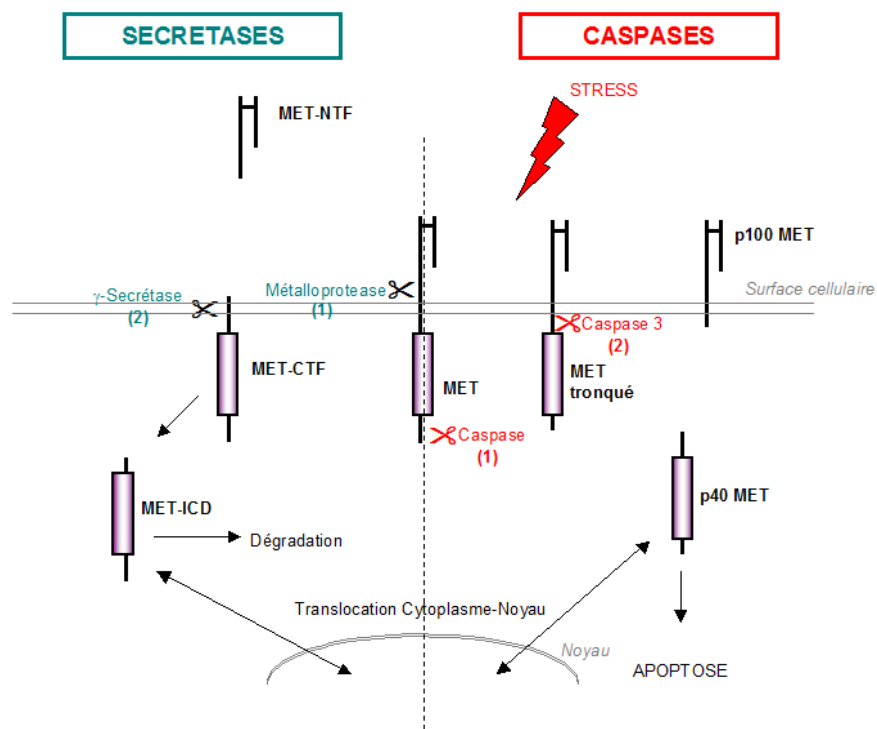


Figure 39 : Schéma récapitulatif des clivages de MET.

Ces deux séries de clivages du récepteur MET sont indépendantes. En effet, les clivages conduisant à la génération de p40 MET n'ont lieu que dans un contexte apoptotique par les caspases et en absence d'HGF/SF. De plus, l'inhibition pharmacologique des clivages de PS-RIP durant l'apoptose n'a aucune conséquence sur la génération de p40 MET (résultat non montré). D'autre part, les clivages générant MET-ICD, MET-CTF et MET-NTF ont lieu de manière constitutive et impliquent les métalloprotéases et la  $\gamma$ -secrétase. L'inhibition de l'activation des caspases n'a pas d'influence sur la génération des fragments issus de la PS-RIP. Ainsi, ces deux types de protéolyse sont indépendants l'un de l'autre et possèdent chacun ses spécificités.

Cependant, ils partagent un certain nombre de caractéristiques qui permettent d'envisager la signalisation initiée par MET de manière originale. En effet, pour chacun des clivages, une séquentialité est instaurée. Dans le cas des clivages par les caspases, le clivage en C-terminal précède celui en juxtamembranaire. De même, le clivage par les métalloprotéases est requis pour la mise en place du second par la  $\gamma$ -secrétase. Ainsi, dans les deux cas, un premier clivage sert de régulateur au second, qui conduit à la génération de fragments actifs. Une autre similitude entre la voie des caspases et celle des secrétases est la désolidarisation des domaines extracellulaire et intracellulaire contenant le domaine kinase. Dans les deux cas, un fragment correspondant au domaine extracellulaire, région de liaison à l'HGF/SF, est libéré. Ces fragments obtenus pourraient ainsi servir de leurre au ligand, empêchant sa fixation sur un récepteur MET membranaire pleine longueur. Par contre, si le fragment p100 MET reste membranaire, MET-NTF, lui, devient soluble.

Le même parallèle peut être établi entre p40 MET et MET-ICD. Les deux fragments contiennent le domaine kinase de MET et sont à la fois cytoplasmiques et nucléaires. Cependant, si le fragment p40 MET est stable, MET-ICD est très labile. Cette différence de stabilité est très probablement liée à la différence fonctionnelle de ces deux fragments. Nous pouvons imaginer que le p40 MET généré pendant l'apoptose doit être stable durant le processus pour permettre l'amplification de l'apoptose. Par contre, le fragment MET-ICD est très labile, ce qui pourrait conforter son rôle dans la dégradation de MET. De plus, cette instabilité pourrait permettre une action transcriptionnelle rapide et transitoire.

Les différents clivages de MET vont permettre la génération de fragments biologiquement actifs, capables d'avoir de nouvelles localisations cellulaires. Ces fragments seraient des relais de signalisation, ou des émissaires, permettant de redéployer MET dans de nouveaux compartiments. Avec l'exemple de MET, nous devinons deux intérêts majeurs à la mise en place d'une telle signalisation. Ces clivages peuvent permettre de transformer l'action du récepteur, en convertissant par exemple un récepteur de survie en facteur de mort suite aux clivages par les caspases. Ces clivages peuvent également conduire à l'activation rapide et directe de voies de signalisation en réponse à un stimulus, en évitant les protéines

adaptatrices ou les cascades de signalisation. Les clivages de MET par les secrétases pourraient représenter une sorte d'itinéraire bis de la signalisation.

MET peut directement transférer les informations en devenant lui-même un nouveau messenger de l'information. Ce mode de transfert des informations pourrait se généraliser au sein des récepteurs tyrosine kinase. En effet, comme nous l'avons vu, MET n'est pas le seul récepteur tyrosine kinase sujet aux clivages, et la liste des récepteurs tyrosine kinase cibles s'allongeant, ce mécanisme pourrait s'imposer parmi les voies de signalisation.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Cooper, C.S., et al., *Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line*. Nature, 1984. **311**(5981): p. 29-33.
2. Park, M., et al., *Mechanism of met oncogene activation*. Cell, 1986. **45**(6): p. 895-904.
3. Park, M., et al., *Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(18): p. 6379-83.
4. Rodrigues, G.A. and M. Park, *Dimerization mediated through a leucine zipper activates the oncogenic potential of the met receptor tyrosine kinase*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(11): p. 6711-22.
5. Liu, L., et al., *Chromosome 7 rearrangements in glioblastomas; loci adjacent to EGFR are independently amplified*. J Neuropathol Exp Neurol, 1998. **57**(12): p. 1138-45.
6. Winberg, M.L., et al., *Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance*. Cell, 1998. **95**(7): p. 903-16.
7. Gherardi, E., et al., *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, 2003. **100**(21): p. 12039-44.
8. Stamos, J., et al., *Crystal structure of the HGF beta-chain in complex with the Sema domain of the Met receptor*. Embo J, 2004. **23**(12): p. 2325-35.
9. Bork, P., et al., *Domains in plexins: links to integrins and transcription factors*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(7): p. 261-3.
10. Wang, W., et al., *Structural characterization of autoinhibited c-Met kinase produced by coexpression in bacteria with phosphatase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3563-8.
11. Birchmeier, C., et al., *Met, metastasis, motility and more*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(12): p. 915-25.
12. Nakamura, T., K. Nawa, and A. Ichihara, *Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **122**(3): p. 1450-9.
13. Stoker, M., et al., *Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility*. Nature, 1987. **327**(6119): p. 239-42.
14. Naldini, L., et al., *Scatter factor and hepatocyte growth factor are undistinguishable ligands for the MET receptor*. EMBO J., 1991. **10**: p. 2867-2878.
15. Seki, T., et al., *Organization of the human hepatocyte growth factor-encoding gene*. Gene, 1991. **102**(2): p. 213-9.
16. Gak, E., et al., *Processing of hepatocyte growth factor to the heterodimeric form is required for biological activity*. FEBS Lett, 1992. **311**(1): p. 17-21.
17. Naldini, L., et al., *Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor*. Embo J, 1992. **11**(13): p. 4825-33.
18. Miyazawa, K., et al., *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, 1993. **268**(14): p. 10024-8.
19. Qiu, D., et al., *Roles and regulation of membrane-associated serine proteases*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 3): p. 583-7.
20. Nakamura, T., *Structure and function of hepatocyte growth factor*. Prog Growth Factor Res, 1991. **3**(1): p. 67-85.
21. Lokker, N.A., et al., *Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding*. Embo J, 1992. **11**(7): p. 2503-10.
22. Bottaro, D.P., et al., *Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product*. Science, 1991. **251**(4995): p. 802-4.
23. Rubin, J.S., D.P. Bottaro, and S.A. Aaronson, *Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the c-met proto-oncogene product*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1155**(3): p. 357-71.
24. Kong-Beltran, M., J. Stamos, and D. Wickramasinghe, *The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation*. Cancer Cell, 2004. **6**(1): p. 75-84.
25. Holmes, O., et al., *Insights into the structure/function of hepatocyte growth factor/scatter factor from studies with individual domains*. J Mol Biol, 2007. **367**(2): p. 395-408.



26. Andermarcher, E., M.A. Surani, and E. Gherardi, *Co-expression of the HGF/SF and c-met genes during early mouse embryogenesis precedes reciprocal expression in adjacent tissues during organogenesis*. Dev Genet, 1996. **18**(3): p. 254-66.
27. Bladt, F., et al., *Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud*. Nature, 1995. **376**(6543): p. 768-71.
28. Schmidt, C., et al., *Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development*. Nature, 1995. **373**: p. 699-702.
29. Uehara, Y., et al., *Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor*. Nature, 1995. **373**: p. 702-705.
30. Sonnenberg, E., et al., *Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development*. J Cell Biol, 1993. **123**(1): p. 223-35.
31. Stewart, F., *Roles of mesenchymal-epithelial interactions and hepatocyte growth factor-scatter factor (HGF-SF) in placental development*. Rev Reprod, 1996. **1**(3): p. 144-8.
32. Stern, C.D., et al., *Epithelial scatter factor and development of the chick embryonic axis*. Development, 1990. **110**(4): p. 1271-84.
33. Maina, F. and R. Klein, *Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons*. Nat Neurosci, 1999. **2**(3): p. 213-7.
34. Maina, F., et al., *Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons*. Genes Dev, 1997. **11**(24): p. 3341-50.
35. Yamamoto, Y., et al., *Hepatocyte growth factor (HGF/SF) is a muscle-derived survival factor for a subpopulation of embryonic motoneurons*. Development, 1997. **124**(15): p. 2903-13.
36. Michalopoulos, G.K. and M.C. DeFrances, *Liver regeneration*. Science, 1997. **276**(5309): p. 60-6.
37. Nakamura, T., et al., *Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF*. J Clin Invest, 2000. **106**(12): p. 1511-9.
38. Matsumoto, K. and T. Nakamura, *Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases*. Kidney Int, 2001. **59**(6): p. 2023-38.
39. Rabkin, R., et al., *Hepatocyte growth factor receptor in acute tubular necrosis*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(3): p. 531-40.
40. Bell, A., et al., *The five amino acid-deleted isoform of hepatocyte growth factor promotes carcinogenesis in transgenic mice*. Oncogene, 1999. **18**(4): p. 887-95.
41. Kawaida, K., et al., *Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4357-61.
42. Jin, H., et al., *Early treatment with hepatocyte growth factor improves cardiac function in experimental heart failure induced by myocardial infarction*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **304**(2): p. 654-60.
43. Borowiak, M., et al., *Met provides essential signals for liver regeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10608-13.
44. Huh, C.G., et al., *Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4477-82.
45. Phaneuf, D., et al., *Generation of a mouse expressing a conditional knockout of the hepatocyte growth factor gene: demonstration of impaired liver regeneration*. DNA Cell Biol, 2004. **23**(9): p. 592-603.
46. Maulik, G., et al., *Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(1): p. 41-59.
47. Montesano, R., et al., *Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor*. Cell, 1991. **67**: p. 901-908.
48. Brinkmann, V., et al., *Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells*. J Cell Biol, 1995. **131**(6 Pt 1): p. 1573-86.
49. Kosai, K., et al., *Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **244**(3): p. 683-90.
50. Liu, Y., A.M. Sun, and L.D. Dworkin, *Hepatocyte growth factor protects renal epithelial cells from apoptotic cell death*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **246**(3): p. 821-6.
51. Yo, Y., et al., *Potential role of hepatocyte growth factor in the maintenance of renal structure: anti-apoptotic action of HGF on epithelial cells*. Kidney Int, 1998. **54**(4): p. 1128-38.
52. Reveneau, S., et al., *Inhibition of JNK by HGF/SF prevents apoptosis induced by TNF-alpha*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1010**: p. 100-3.

53. Comoglio, P.M. and L. Trusolino, *Invasive growth: from development to metastasis*. J Clin Invest, 2002. **109**(7): p. 857-62.
54. Gentile, A. and P.M. Comoglio, *Invasive growth: a genetic program*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(5-6): p. 451-6.
55. Prat, M., et al., *Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF*. J Cell Sci, 1998. **111 ( Pt 2)**: p. 237-47.
56. Hartmann, G., et al., *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, 1992. **89**(23): p. 11574-8.
57. Gherardi, E., et al., *Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4046-51.
58. Schwall, R.H., et al., *Heparin induces dimerization and confers proliferative activity onto the hepatocyte growth factor antagonists NK1 and NK2*. J Cell Biol, 1996. **133**(3): p. 709-18.
59. Hartmann, G., et al., *Engineered mutants of HGF/SF with reduced binding to heparan sulphate proteoglycans, decreased clearance and enhanced activity in vivo*. Curr Biol, 1998. **8**(3): p. 125-34.
60. DiGabriele, A.D., et al., *Structure of a heparin-linked biologically active dimer of fibroblast growth factor*. Nature, 1998. **393**(6687): p. 812-7.
61. Dickson, C., et al., *Tyrosine kinase signalling in breast cancer: fibroblast growth factors and their receptors*. Breast Cancer Res, 2000. **2**(3): p. 191-6.
62. Ferracini, R., et al., *Identification of the major autophosphorylation site of the Met/hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase*. J Biol Chem, 1991. **266**(29): p. 19558-64.
63. Rodrigues, G.A. and M. Park, *Oncogenic activation of tyrosine kinases*. Curr Opin Genet Dev, 1994. **4**(1): p. 15-24.
64. Longati, P., et al., *Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor)*. Oncogene, 1994. **9**(1): p. 49-57.
65. Tulasne, D., et al., *The multisubstrate docking site of the MET receptor is dispensable for MET-mediated RAS signaling and cell scattering*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(3): p. 551-65.
66. Weidner, K.M., M. Sachs, and W. Birchmeier, *Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995. **92**: p. 2597-2601.
67. Peschard, P., et al., *Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein*. Mol Cell, 2001. **8**(5): p. 995-1004.
68. Gandino, L., et al., *Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase*. J Biol Chem, 1994. **269**(3): p. 1815-20.
69. Hashigasako, A., et al., *Bi-directional regulation of Ser-985 phosphorylation of c-met via protein kinase C and protein phosphatase 2A involves c-Met activation and cellular responsiveness to hepatocyte growth factor*. J Biol Chem, 2004. **279**(25): p. 26445-52.
70. Crepaldi, T., et al., *Generation of a truncated hepatocyte growth factor receptor in the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 1994. **269**(3): p. 1750-5.
71. Lee, C.C. and K.M. Yamada, *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, 1995. **270**(2): p. 507-10.
72. Vigna, E., et al., *Loss of the exon encoding the juxtamembrane domain is essential for the oncogenic activation of TPR-MET*. Oncogene, 1999. **18**(29): p. 4275-81.
73. Songyang, Z., et al., *Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(4): p. 2777-85.
74. Fixman, E.D., et al., *Efficient cell transformation by the Tpr-Met oncoprotein is dependent upon tyrosine 489 in the carboxy-terminus*. Oncogene, 1995. **10**(2): p. 237-49.
75. Ponzetto, C., et al., *A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family*. Cell, 1994. **77**: p. 261-271.
76. Pelicci, G., et al., *The motogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein*. Oncogene, 1995. **10**(8): p. 1631-8.
77. Furge, K.A., Y.W. Zhang, and G.F. Vande Woude, *Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5582-9.
78. Tulasne, D., et al., *Involvement of RAS-ERK signaling in multiple biological responses to HGF/SF*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **973**: p. 105-8.

79. Maroun, C.R., et al., *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, 2000. **20**(22): p. 8513-25.
80. Potempa, S. and A.J. Ridley, *Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly.* Mol Biol Cell, 1998. **9**(8): p. 2185-200.
81. Hartmann, G., et al., *The motility signal of scatter factor/hepatocyte growth factor mediated through the receptor tyrosine kinase met requires intracellular action of Ras.* J Biol Chem, 1994. **269**(35): p. 21936-9.
82. Ridley, A.J., P.M. Comoglio, and A. Hall, *Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(2): p. 1110-22.
83. Vanhaesebroeck, B., et al., *Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice.* Trends Biochem Sci, 2005. **30**(4): p. 194-204.
84. Ponzetto, C., et al., *A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(8): p. 4600-8.
85. Fresno Vara, J.A., et al., *PI3K/Akt signalling pathway and cancer.* Cancer Treat Rev, 2004. **30**(2): p. 193-204.
86. Fan, S., et al., *The cytokine hepatocyte growth factor/scatter factor inhibits apoptosis and enhances DNA repair by a common mechanism involving signaling through phosphatidylinositol 3' kinase.* Oncogene, 2000. **19**(18): p. 2212-23.
87. Bowers, D.C., et al., *Scatter factor/hepatocyte growth factor protects against cytotoxic death in human glioblastoma via phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT- dependent pathways.* Cancer Res, 2000. **60**(15): p. 4277-83.
88. Xiao, G.H., et al., *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**(1): p. 247-52.
89. Schulze-Bergkamen, H., et al., *Hepatocyte growth factor induces Mcl-1 in primary human hepatocytes and inhibits CD95-mediated apoptosis via Akt.* Hepatology, 2004. **39**(3): p. 645-54.
90. Lock, L.S., et al., *Grb2-independent recruitment of Gab1 requires the C-terminal lobe and structural integrity of the Met receptor kinase domain.* J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 30083-90.
91. Lock, L.S., et al., *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, 2000. **275**(40): p. 31536-45.
92. Schaeper, U., et al., *Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses.* J Cell Biol, 2000. **149**(7): p. 1419-32.
93. Sachs, M., et al., *Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo.* J Cell Biol, 2000. **150**(6): p. 1375-84.
94. Gual, P., et al., *Sustained recruitment of phospholipase C-gamma to Gab1 is required for HGF-induced branching tubulogenesis.* Oncogene, 2000. **19**(12): p. 1509-18.
95. Cunnick, J.M., et al., *Regulation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway by SHP2.* J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9498-504.
96. Fan, S., et al., *The multisubstrate adapter Gab1 regulates hepatocyte growth factor (scatter factor)-c-Met signaling for cell survival and DNA repair.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(15): p. 4968-84.
97. Maroun, C.R., et al., *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, 1999. **19**(3): p. 1784-99.
98. Niemann, C., et al., *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**(2): p. 533-45.
99. Maina, F., et al., *Coupling Met to specific pathways results in distinct developmental outcomes.* Mol Cell, 2001. **7**(6): p. 1293-306.
100. Maina, F., et al., *Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development.* Cell, 1996. **87**(3): p. 531-42.
101. Schmidt, M.H. and I. Dikic, *The Cbl interactome and its functions.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(12): p. 907-19.

102. Peschard, P., et al., *A conserved DpYR motif in the juxtamembrane domain of the Met receptor family forms an atypical c-Cbl/Cbl-b tyrosine kinase binding domain binding site required for suppression of oncogenic activation.* J Biol Chem, 2004. **279**(28): p. 29565-71.
103. Petrelli, A., et al., *The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met.* Nature, 2002. **416**(6877): p. 187-90.
104. Oved, S. and Y. Yarden, *Signal transduction: molecular ticket to enter cells.* Nature, 2002. **416**(6877): p. 133-6.
105. Urbe, S., et al., *Endosomal localization and receptor dynamics determine tyrosine phosphorylation of hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(20): p. 7685-92.
106. Urbe, S., et al., *The UIM domain of Hrs couples receptor sorting to vesicle formation.* J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 20): p. 4169-79.
107. Abella, J.V., et al., *Met/Hepatocyte growth factor receptor ubiquitination suppresses transformation and is required for Hrs phosphorylation.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9632-45.
108. Mak, H.H., et al., *Oncogenic activation of the Met receptor tyrosine kinase fusion protein, Tpr-Met, involves exclusion from the endocytic degradative pathway.* Oncogene, 2007.
109. Peschard, P. and M. Park, *Escape from Cbl-mediated downregulation: a recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases.* Cancer Cell, 2003. **3**(6): p. 519-23.
110. Peschard, P. and M. Park, *From Tpr-Met to Met, tumorigenesis and tubes.* Oncogene, 2007. **26**(9): p. 1276-85.
111. Nagamine, K., et al., *Dissociation of c-fos induction and mitogen-activated-protein kinase activation from the hepatocyte-growth-factor-induced motility response in human gastric carcinoma cells.* Eur J Biochem, 1996. **236**(2): p. 476-81.
112. Abounader, R., et al., *Signaling pathways in the induction of c-met receptor expression by its ligand scatter factor/hepatocyte growth factor in human glioblastoma.* J Neurochem, 2001. **76**(5): p. 1497-508.
113. Greenberg, M.E., E.B. Ziff, and L.A. Greene, *Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription.* Science, 1986. **234**(4772): p. 80-3.
114. Sassone-Corsi, P. and I.M. Verma, *Modulation of c-fos gene transcription by negative and positive cellular factors.* Nature, 1987. **326**(6112): p. 507-10.
115. Fafeur, V., et al., *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., 1997. **8**: p. 655-665.
116. Hanzawa, M., et al., *Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes.* Carcinogenesis, 2000. **21**(6): p. 1079-85.
117. McCawley, L.J., P. O'Brien, and L.G. Hudson, *Epidermal growth factor (EGF)- and scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF)- mediated keratinocyte migration is coincident with induction of matrix metalloproteinase (MMP)-9.* J Cell Physiol, 1998. **176**(2): p. 255-65.
118. Castagnino, P., et al., *Induction of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 is a delayed early cellular response to hepatocyte growth factor.* Oncogene, 1998. **17**(4): p. 481-92.
119. Chiu, S.J., et al., *Hepatocyte growth factor upregulates alpha2beta1 integrin in Madin-Darby canine kidney cells: implications in tubulogenesis.* J Biomed Sci, 2002. **9**(3): p. 261-72.
120. Liang, C.C. and H.C. Chen, *Sustained activation of extracellular signal-regulated kinase stimulated by hepatocyte growth factor leads to integrin alpha 2 expression that is involved in cell scattering.* J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21146-52.
121. Tanimura, S., et al., *Prolonged nuclear retention of activated extracellular signal-regulated kinase 1/2 is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility.* J Biol Chem, 2002. **277**(31): p. 28256-64.
122. Saelman, E.U., P.J. Keely, and S.A. Santoro, *Loss of MDCK cell alpha 2 beta 1 integrin expression results in reduced cyst formation, failure of hepatocyte growth factor/scatter factor-induced branching morphogenesis, and increased apoptosis.* J Cell Sci, 1995. **108** ( Pt 11): p. 3531-40.
123. Jiang, Y., et al., *Invasiveness of hepatocellular carcinoma cell lines: contribution of hepatocyte growth factor, c-met, and transcription factor Ets-1.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **286**(5): p. 1123-30.
124. Fan, S., et al., *Scatter factor protects epithelial and carcinoma cells against apoptosis induced by DNA-damaging agents.* Oncogene, 1998. **17**(2): p. 131-41.

125. Yamamoto, K., et al., *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**(5): p. 1341-8.
126. Nakagami, H., et al., *Hepatocyte growth factor prevents endothelial cell death through inhibition of bax translocation from cytosol to mitochondrial membrane.* Diabetes, 2002. **51**(8): p. 2604-11.
127. Fan, S., et al., *Role of NF-kappaB signaling in hepatocyte growth factor/scatter factor-mediated cell protection.* Oncogene, 2005. **24**(10): p. 1749-66.
128. Moumen, A., et al., *Met acts on Mdm2 via mTOR to signal cell survival during development.* Development, 2007. **134**(7): p. 1443-51.
129. Leroy, C., et al., *HGF/SF regulates expression of apoptotic genes in MCF-10A human mammary epithelial cells.* Ann N Y Acad Sci, 2006. **1090**: p. 188-202.
130. Corso, S., P.M. Comoglio, and S. Giordano, *Cancer therapy: can the challenge be MET?* Trends Mol Med, 2005. **11**(6): p. 284-92.
131. Bertotti, A., P.M. Comoglio, and L. Trusolino, *Beta4 integrin activates a Shp2-Src signaling pathway that sustains HGF-induced anchorage-independent growth.* J Cell Biol, 2006. **175**(6): p. 993-1003.
132. Chan, P.C., et al., *Crosstalk between hepatocyte growth factor and integrin signaling pathways.* J Biomed Sci, 2006. **13**(2): p. 215-23.
133. Bertotti, A., P.M. Comoglio, and L. Trusolino, *Beta4 integrin is a transforming molecule that unleashes Met tyrosine kinase tumorigenesis.* Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10674-9.
134. Mercurio, A.M., I. Rabinovitz, and L.M. Shaw, *The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration.* Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(5): p. 541-5.
135. Naor, D., R.V. Sionov, and D. Ish-Shalom, *CD44: structure, function, and association with the malignant process.* Adv Cancer Res, 1997. **71**: p. 241-319.
136. Ponta, H., D. Wainwright, and P. Herrlich, *The CD44 protein family.* Int J Biochem Cell Biol, 1998. **30**(3): p. 299-305.
137. van der Voort, R., et al., *Heparan sulfate-modified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor-induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met.* J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6499-506.
138. Orian-Rousseau, V., et al., *CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling.* Genes Dev, 2002. **16**(23): p. 3074-86.
139. Wang, X., et al., *A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met.* Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 411-21.
140. Zhao, Y., et al., *Promotion of Fas-mediated apoptosis in Type II cells by high doses of hepatocyte growth factor bypasses the mitochondrial requirement.* J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 556-63.
141. Smyth, L.A. and H.J. Brady, *cMet and Fas receptor interaction inhibits death-inducing signaling complex formation in endothelial cells.* Hypertension, 2005. **46**(1): p. 100-6.
142. Conrotto, P., et al., *Interplay between scatter factor receptors and B plexins controls invasive growth.* Oncogene, 2004. **23**(30): p. 5131-7.
143. Kruger, R.P., J. Aurandt, and K.L. Guan, *Semaphorins command cells to move.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(10): p. 789-800.
144. Giordano, S., et al., *The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met.* Nat Cell Biol, 2002. **4**(9): p. 720-4.
145. Artigiani, S., et al., *Plexin-B3 is a functional receptor for semaphorin 5A.* EMBO Rep, 2004. **5**(7): p. 710-4.
146. Conrotto, P., et al., *Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1.* Blood, 2005. **105**(11): p. 4321-9.
147. Jo, M., et al., *Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells.* J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8806-11.
148. Bergstrom, J.D., B. Westermark, and N.E. Heldin, *Epidermal growth factor receptor signaling activates met in human anaplastic thyroid carcinoma cells.* Exp Cell Res, 2000. **259**(1): p. 293-9.
149. Fischer, O.M., et al., *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, 2004. **279**(28): p. 28970-8.
150. Follenzi, A., et al., *Cross-talk between the proto-oncogenes Met and Ron.* Oncogene, 2000. **19**(27): p. 3041-9.

151. Maggiora, P., et al., *The RON and MET oncogenes are co-expressed in human ovarian carcinomas and cooperate in activating invasiveness*. *Exp Cell Res*, 2003. **288**(2): p. 382-9.
152. Liang, T.J., et al., *Transgenic expression of tpr-met oncogene leads to development of mammary hyperplasia and tumors*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(12): p. 2872-7.
153. Soman, N.R., et al., *The TPR-MET oncogenic rearrangement is present and expressed in human gastric carcinoma and precursor lesions*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(11): p. 4892-6.
154. Heideman, D.A., et al., *Absence of tpr-met and expression of c-met in human gastric mucosa and carcinoma*. *J Pathol*, 2001. **194**(4): p. 428-35.
155. Danilkovitch-Miagkova, A. and B. Zbar, *Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(7): p. 863-7.
156. Rong, S., et al., *Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(11): p. 4731-5.
157. Takayama, H., et al., *Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(2): p. 701-6.
158. Abounader, R., et al., *In vivo targeting of SF/HGF and c-met expression via U1snRNA/ribozymes inhibits glioma growth and angiogenesis and promotes apoptosis*. *Faseb J*, 2002. **16**(1): p. 108-10.
159. Ponzetto, C., et al., *c-met is amplified but not mutated in a cell line with an activated met tyrosine kinase*. *Oncogene*, 1991. **6**(4): p. 553-9.
160. Ivan, M., et al., *Activated ras and ret oncogenes induce over-expression of c-met (hepatocyte growth factor receptor) in human thyroid epithelial cells*. *Oncogene*, 1997. **14**(20): p. 2417-23.
161. Gambarotta, G., et al., *Ets up-regulates MET transcription*. *Oncogene*, 1996. **13**(9): p. 1911-7.
162. Pennacchietti, S., et al., *Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene*. *Cancer Cell*, 2003. **3**(4): p. 347-61.
163. Jeffers, M., et al., *Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997. **94**: p. 11445-11450.
164. Di Renzo, M.F., et al., *Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas*. *Oncogene*, 2000. **19**(12): p. 1547-55.
165. Lorenzato, A., et al., *Novel somatic mutations of the MET oncogene in human carcinoma metastases activating cell motility and invasion*. *Cancer Res*, 2002. **62**(23): p. 7025-30.
166. Chiara, F., et al., *Mutations in the met oncogene unveil a "dual switch" mechanism controlling tyrosine kinase activity*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(31): p. 29352-8.
167. Cristiani, C., et al., *Regulation of the wild-type and Y1235D mutant Met kinase activation*. *Biochemistry*, 2005. **44**(43): p. 14110-9.
168. Ma, P.C., et al., *c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions*. *Cancer Res*, 2003. **63**(19): p. 6272-81.
169. Graveel, C., et al., *Activating Met mutations produce unique tumor profiles in mice with selective duplication of the mutant allele*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(49): p. 17198-203.
170. Graveel, C.R., C.A. London, and G.F. Vande Woude, *A mouse model of activating Met mutations*. *Cell Cycle*, 2005. **4**(4): p. 518-20.
171. Matsumoto, K. and T. Nakamura, *NK4 (HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor) in cancer biology and therapeutics*. *Cancer Sci*, 2003. **94**(4): p. 321-7.
172. Heideman, D.A., et al., *Suppression of tumor growth, invasion and angiogenesis of human gastric cancer by adenovirus-mediated expression of NK4*. *J Gene Med*, 2004. **6**(3): p. 317-27.
173. Cao, B., et al., *Neutralizing monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) display antitumor activity in animal models*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(13): p. 7443-8.
174. Kim, K.J., et al., *Systemic anti-hepatocyte growth factor monoclonal antibody therapy induces the regression of intracranial glioma xenografts*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(4): p. 1292-8.
175. Burgess, T., et al., *Fully human monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor with therapeutic potential against hepatocyte growth factor/c-Met-dependent human tumors*. *Cancer Res*, 2006. **66**(3): p. 1721-9.
176. Mazzone, M., et al., *An uncleavable form of pro-scatter factor suppresses tumor growth and dissemination in mice*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(10): p. 1418-32.

177. Morotti, A., et al., *K252a inhibits the oncogenic properties of Met, the HGF receptor*. *Oncogene*, 2002. **21**(32): p. 4885-93.
178. Haluska, P. and A.A. Adjei, *Receptor tyrosine kinase inhibitors*. *Curr Opin Investig Drugs*, 2001. **2**(2): p. 280-6.
179. Christensen, J.G., et al., *A selective small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met-dependent phenotypes in vitro and exhibits cytoreductive antitumor activity in vivo*. *Cancer Res*, 2003. **63**(21): p. 7345-55.
180. Berthou, S., et al., *The Met kinase inhibitor SU11274 exhibits a selective inhibition pattern toward different receptor mutated variants*. *Oncogene*, 2004. **23**(31): p. 5387-93.
181. Sattler, M., et al., *A novel small molecule met inhibitor induces apoptosis in cells transformed by the oncogenic TPR-MET tyrosine kinase*. *Cancer Res*, 2003. **63**(17): p. 5462-9.
182. Smolen, G.A., et al., *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*, 2006. **103**(7): p. 2316-21.
183. Stabile, L.P., et al., *Inhibition of human non-small cell lung tumors by a c-Met antisense/U6 expression plasmid strategy*. *Gene Ther*, 2004. **11**(3): p. 325-35.
184. Jiang, W.G., et al., *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*, 2003. **9**(11): p. 4274-81.
185. Shinomiya, N., et al., *RNA interference reveals that ligand-independent met activity is required for tumor cell signaling and survival*. *Cancer Res*, 2004. **64**(21): p. 7962-70.
186. Furge, K.A., et al., *Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(19): p. 10722-7.
187. Firon, M., et al., *Dominant negative Met reduces tumorigenicity-metastasis and increases tubule formation in mammary cells*. *Oncogene*, 2000. **19**(20): p. 2386-97.
188. Michieli, P., et al., *Targeting the tumor and its microenvironment by a dual-function decoy Met receptor*. *Cancer Cell*, 2004. **6**(1): p. 61-73.
189. Prat, M., et al., *C-terminal truncated forms of Met, the hepatocyte growth factor receptor*. *Mol Cell Biol*, 1991. **11**(12): p. 5954-62.
190. Jeffers, M., et al., *Degradation of the Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(2): p. 799-808.
191. Schweichel, J.U. and H.J. Merker, *The morphology of various types of cell death in prenatal tissues*. *Teratology*, 1973. **7**(3): p. 253-66.
192. Krammer, P.H., *CD95's deadly mission in the immune system*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 789-95.
193. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
194. Spurgers, K.B., et al., *Molecular mediators of cell death in multistep carcinogenesis: a path to targeted therapy*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(8): p. 1360-70.
195. Ekshyyan, O. and T.Y. Aw, *Apoptosis: a key in neurodegenerative disorders*. *Curr Neurovasc Res*, 2004. **1**(4): p. 355-71.
196. Loh, K.P., et al., *Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury*. *Curr Alzheimer Res*, 2006. **3**(4): p. 327-37.
197. Wyllie, A.H., J.F. Kerr, and A.R. Currie, *Cell death: the significance of apoptosis*. *Int Rev Cytol*, 1980. **68**: p. 251-306.
198. Clarke, P.G., *Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms*. *Anat Embryol (Berl)*, 1990. **181**(3): p. 195-213.
199. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. *Annu Rev Biochem*, 1999. **68**: p. 383-424.
200. Thornberry, N.A., A. Rosen, and D.W. Nicholson, *Control of apoptosis by proteases*. *Adv Pharmacol*, 1997. **41**: p. 155-77.
201. Lavrik, I.N., A. Golks, and P.H. Krammer, *Caspases: pharmacological manipulation of cell death*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(10): p. 2665-72.
202. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis*. *Biochem J*, 1997. **326** ( Pt 1): p. 1-16.
203. Green, D.R., *Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors*. *Cell*, 2000. **102**(1): p. 1-4.
204. Marchetti, P., *[Apoptosis: basic knowledge and applications]*. *Gynecol Obstet Fertil*, 2005. **33**(9): p. 632-41.

205. Fischer, U., R.U. Janicke, and K. Schulze-Osthoff, *Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 76-100.
206. Widmann, C., S. Gibson, and G.L. Johnson, *Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals*. J Biol Chem, 1998. **273**(12): p. 7141-7.
207. Karin, M., *How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6867-74.
208. Karin, M., *The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27339-42.
209. Wang, C.Y., M.W. Mayo, and A.S. Baldwin, Jr., *TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB*. Science, 1996. **274**(5288): p. 784-7.
210. Van Antwerp, D.J., et al., *Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB*. Science, 1996. **274**(5288): p. 787-9.
211. Barkett, M. and T.D. Gilmore, *Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6910-24.
212. Zong, W.X., et al., *The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(4): p. 382-7.
213. Wang, D. and A.S. Baldwin, Jr., *Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529*. J Biol Chem, 1998. **273**(45): p. 29411-6.
214. Kim, H.S., et al., *Caspase-mediated p65 cleavage promotes TRAIL-induced apoptosis*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6111-9.
215. Baxa, D.M. and F.K. Yoshimura, *Genistein reduces NF-kappa B in T lymphoma cells via a caspase-mediated cleavage of I kappa B alpha*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(6): p. 1009-18.
216. Henkler, F., et al., *Caspase-mediated cleavage converts the tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor (TRAF)-1 from a selective modulator of TNF receptor signaling to a general inhibitor of NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2003. **278**(31): p. 29216-30.
217. Bokoch, G.M., *Caspase-mediated activation of PAK2 during apoptosis: proteolytic kinase activation as a general mechanism of apoptotic signal transduction?* Cell Death Differ, 1998. **5**(8): p. 637-45.
218. Coleman, M.L., et al., *Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(4): p. 339-45.
219. Sebbagh, M., et al., *Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(4): p. 346-52.
220. Nagata, S., *Fas ligand-induced apoptosis*. Annu Rev Genet, 1999. **33**: p. 29-55.
221. Graves, J.D., et al., *Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1*. Embo J, 1998. **17**(8): p. 2224-34.
222. Creasy, C.L., D.M. Ambrose, and J. Chernoff, *The Ste20-like protein kinase, Mst1, dimerizes and contains an inhibitory domain*. J Biol Chem, 1996. **271**(35): p. 21049-53.
223. Ura, S., et al., *Caspase cleavage of MST1 promotes nuclear translocation and chromatin condensation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10148-53.
224. Jakobi, R., *Subcellular targeting regulates the function of caspase-activated protein kinases in apoptosis*. Drug Resist Updat, 2004. **7**(1): p. 11-7.
225. Bredesen, D.E., P. Mehlen, and S. Rabizadeh, *Receptors that mediate cellular dependence*. Cell Death Differ, 2005. **12**(8): p. 1031-43.
226. Mehlen, P. and C. Thibert, *Dependence receptors: between life and death*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(15): p. 1854-66.
227. Graf, D., J.G. Bode, and D. Haussinger, *Caspases and receptor cleavage*. Arch Biochem Biophys, 2007. **462**(2): p. 162-70.
228. Mehlen, P. and D.E. Bredesen, *The dependence receptor hypothesis*. Apoptosis, 2004. **9**(1): p. 37-49.
229. Bordeaux, M.C., et al., *The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease*. Embo J, 2000. **19**(15): p. 4056-63.
230. Cho, K.R. and E.R. Fearon, *DCC: linking tumor suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer?* Curr Opin Genet Dev, 1995. **5**(1): p. 72-8.
231. Hedrick, L., et al., *The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis*. Genes Dev, 1994. **8**(10): p. 1174-83.
232. Keino-Masu, K., et al., *Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor*. Cell, 1996. **87**(2): p. 175-85.



233. Forcet, C., et al., *The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3416-21.
234. Liu, J., et al., *Mediation of the DCC apoptotic signal by DIP13 alpha*. J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 26281-5.
235. Stein, E. and M. Tessier-Lavigne, *Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex*. Science, 2001. **291**(5510): p. 1928-38.
236. Stein, E., et al., *Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation*. Science, 2001. **291**(5510): p. 1976-82.
237. Mehlen, P., et al., *The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis*. Nature, 1998. **395**(6704): p. 801-4.
238. Llambi, F., et al., *Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC*. Embo J, 2001. **20**(11): p. 2715-22.
239. Fearon, E.R., et al., *Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers*. Science, 1990. **247**(4938): p. 49-56.
240. Cho, K.R., et al., *The DCC gene: structural analysis and mutations in colorectal carcinomas*. Genomics, 1994. **19**(3): p. 525-31.
241. Mazelin, L., et al., *Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis*. Nature, 2004. **431**(7004): p. 80-4.
242. Klingelutz, A.J., et al., *Alteration of the DCC tumor-suppressor gene in tumorigenic HPV-18 immortalized human keratinocytes transformed by nitrosomethylurea*. Oncogene, 1993. **8**(1): p. 95-9.
243. Velcich, A., et al., *Altered phenotype of HT29 colonic adenocarcinoma cells following expression of the DCC gene*. Oncogene, 1999. **18**(16): p. 2599-606.
244. Kato, H., et al., *Suppressed tumorigenicity of human endometrial cancer cells by the restored expression of the DCC gene*. Br J Cancer, 2000. **82**(2): p. 459-66.
245. Mehlen, P. and C. Furne, *Netrin-1: when a neuronal guidance cue turns out to be a regulator of tumorigenesis*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(22): p. 2599-616.
246. Bosenberg, M.W. and J. Massague, *Juxtacrine cell signaling molecules*. Curr Opin Cell Biol, 1993. **5**(5): p. 832-8.
247. Blobel, C.P., *Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch*. Cell, 1997. **90**(4): p. 589-92.
248. Werb, Z. and Y. Yan, *A cellular stripease act*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1279-80.
249. Arribas, J. and J. Massague, *Transforming growth factor-alpha and beta-amyloid precursor protein share a secretory mechanism*. J Cell Biol, 1995. **128**(3): p. 433-41.
250. Ahmad, M., et al., *Cleavage of amyloid-beta precursor protein (APP) by membrane-type matrix metalloproteinases*. J Biochem (Tokyo), 2006. **139**(3): p. 517-26.
251. Brule, S., et al., *The shedding of syndecan-4 and syndecan-1 from HeLa cells and human primary macrophages is accelerated by SDF-1/CXCL12 and mediated by the matrix metalloproteinase-9*. Glycobiology, 2006. **16**(6): p. 488-501.
252. Ehlers, M.R., Y.N. Chen, and J.F. Riordan, *Spontaneous solubilization of membrane-bound human testis angiotensin-converting enzyme expressed in Chinese hamster ovary cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(3): p. 1009-13.
253. Rose-John, S. and P.C. Heinrich, *Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function*. Biochem J, 1994. **300** ( Pt 2): p. 281-90.
254. Garton, K.J., P.J. Gough, and E.W. Raines, *Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(6): p. 1105-16.
255. Schlondorff, J., J.D. Becherer, and C.P. Blobel, *Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE)*. Biochem J, 2000. **347** Pt 1: p. 131-8.
256. Huovila, A.P., et al., *Shedding light on ADAM metalloproteinases*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(7): p. 413-22.
257. Massague, J. and A. Pandiella, *Membrane-anchored growth factors*. Annu Rev Biochem, 1993. **62**: p. 515-41.
258. Downing, J.R., M.F. Roussel, and C.J. Sherr, *Ligand and protein kinase C downmodulate the colony-stimulating factor 1 receptor by independent mechanisms*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(7): p. 2890-6.
259. Porteu, F. and C. Nathan, *Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils*. J Exp Med, 1990. **172**(2): p. 599-607.

260. Yee, N.S., et al., *Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C.* J Biol Chem, 1994. **269**(50): p. 31991-8.
261. Cabrera, N., et al., *TrkA receptor ectodomain cleavage generates a tyrosine-phosphorylated cell-associated fragment.* J Cell Biol, 1996. **132**(3): p. 427-36.
262. Vecchi, M., J. Baulida, and G. Carpenter, *Selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation.* J Biol Chem, 1996. **271**(31): p. 18989-95.
263. Kishimoto, T.K., K. O'Conner, and T.A. Springer, *Leukocyte adhesion deficiency. Aberrant splicing of a conserved integrin sequence causes a moderate deficiency phenotype.* J Biol Chem, 1989. **264**(6): p. 3588-95.
264. Ehlers, M.R. and J.F. Riordan, *Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins.* Biochemistry, 1991. **30**(42): p. 10065-74.
265. White, J.M., *ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions.* Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(5): p. 598-606.
266. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 463-516.
267. Pandiella, A. and J. Massague, *Multiple signals activate cleavage of the membrane transforming growth factor-alpha precursor.* J Biol Chem, 1991. **266**(9): p. 5769-73.
268. Seals, D.F. and S.A. Courtneidge, *The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions.* Genes Dev, 2003. **17**(1): p. 7-30.
269. Blobel, C.P., *ADAMs: key components in EGFR signalling and development.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 32-43.
270. Anklesaria, P., et al., *Cell-cell adhesion mediated by binding of membrane-anchored transforming growth factor alpha to epidermal growth factor receptors promotes cell proliferation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(9): p. 3289-93.
271. Brummendorf, T., S. Kenwrick, and F.G. Rathjen, *Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations.* Curr Opin Neurobiol, 1998. **8**(1): p. 87-97.
272. Gutwein, P., et al., *Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells.* J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 15490-7.
273. Heiz, M., et al., *Hepatocyte growth factor-induced ectodomain shedding of cell adhesion molecule L1: role of the L1 cytoplasmic domain.* J Biol Chem, 2004. **279**(30): p. 31149-56.
274. Maretzky, T., et al., *L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(20): p. 9040-53.
275. Montgomery, A.M., et al., *Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3.* J Cell Biol, 1996. **132**(3): p. 475-85.
276. Oleszewski, M., et al., *Characterization of the L1-neurocan-binding site. Implications for L1-L1 homophilic binding.* J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34478-85.
277. Mechtersheimer, S., et al., *Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins.* J Cell Biol, 2001. **155**(4): p. 661-73.
278. Fogel, M., et al., *L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas.* Lancet, 2003. **362**(9387): p. 869-75.
279. Kalus, I., et al., *The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1.* J Biol Chem, 2003. **278**(12): p. 10381-8.
280. Carpenter, A., et al., *Differences in the shedding of soluble TNF receptors between endotoxin-sensitive and endotoxin-resistant mice in response to lipopolysaccharide or live bacterial challenge.* J Immunol, 1995. **155**(4): p. 2005-12.
281. Crowe, P.D., et al., *A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the 80-kD TNF receptor and TNF processing in T lymphocytes.* J Exp Med, 1995. **181**(3): p. 1205-10.
282. Aderka, D., et al., *Shedding kinetics of soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors after systemic TNF leaking during isolated limb perfusion. Relevance to the pathophysiology of septic shock.* J Clin Invest, 1998. **101**(3): p. 650-9.
283. Dri, P., et al., *TNF-Induced shedding of TNF receptors in human polymorphonuclear leukocytes: role of the 55-kDa TNF receptor and involvement of a membrane-bound and non-matrix metalloproteinase.* J Immunol, 2000. **165**(4): p. 2165-72.

284. Van Zee, K.J., et al., *Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(11): p. 4845-9.
285. McDermott, M.F., et al., *Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes*. Cell, 1999. **97**(1): p. 133-44.
286. Stojanov, V., et al., *[Thoracic electrical bioimpedance in the follow-up of patients with cardiovascular disorders]*. Srp Arh Celok Lek, 2005. **133**(5-6): p. 297-302.
287. Slamon, D.J., *Proto-oncogenes and human cancers*. N Engl J Med, 1987. **317**(15): p. 955-7.
288. Liu, X., et al., *Selective inhibition of ADAM metalloproteases blocks HER-2 extracellular domain (ECD) cleavage and potentiates the anti-tumor effects of trastuzumab*. Cancer Biol Ther, 2006. **5**(6): p. 648-56.
289. Christianson, T.A., et al., *NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer*. Cancer Res, 1998. **58**(22): p. 5123-9.
290. Di Fiore, P.P., et al., *erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells*. Science, 1987. **237**(4811): p. 178-82.
291. Segatto, O., et al., *Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(12): p. 5570-4.
292. Molina, M.A., et al., *Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells*. Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4744-9.
293. Wolfe, M.S., et al., *Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease*. Biochemistry, 1999. **38**(35): p. 11223-30.
294. Wolfe, M.S., et al., *Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity*. Nature, 1999. **398**(6727): p. 513-7.
295. Rawson, R.B., et al., *Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs*. Mol Cell, 1997. **1**(1): p. 47-57.
296. Rudner, D.Z., P. Fawcett, and R. Losick, *A family of membrane-embedded metalloproteases involved in regulated proteolysis of membrane-associated transcription factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 14765-70.
297. Urban, S., J.R. Lee, and M. Freeman, *Drosophila rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases*. Cell, 2001. **107**(2): p. 173-82.
298. Weihofen, A., et al., *Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease*. Science, 2002. **296**(5576): p. 2215-8.
299. Urban, S. and M. Freeman, *Intramembrane proteolysis controls diverse signalling pathways throughout evolution*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(5): p. 512-8.
300. Weihofen, A. and B. Martoglio, *Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides*. Trends Cell Biol, 2003. **13**(2): p. 71-8.
301. Goldstein, J.L., et al., *The CRAL/TRIO and GOLD domain protein CGR-1 promotes induction of vulval cell fates in Caenorhabditis elegans and interacts genetically with the Ras signaling pathway*. Genetics, 2006. **172**(2): p. 929-42.
302. Bier, J., B. Sharaf, and H. Gewirtz, *Origin of anterior interventricular vein blood in domestic swine*. Am J Physiol, 1991. **260**(5 Pt 2): p. H1732-6.
303. Wasserman, J.D. and M. Freeman, *Control of EGF receptor activation in Drosophila*. Trends Cell Biol, 1997. **7**(11): p. 431-6.
304. Landman, N. and T.W. Kim, *Got RIP? Presenilin-dependent intramembrane proteolysis in growth factor receptor signaling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(5): p. 337-51.
305. Struhl, G. and A. Adachi, *Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins*. Mol Cell, 2000. **6**(3): p. 625-36.
306. Kopan, R. and M.X. Ilagan, *Gamma-secretase: proteasome of the membrane?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(6): p. 499-504.
307. Doan, A., et al., *Protein topology of presenilin 1*. Neuron, 1996. **17**(5): p. 1023-30.
308. Li, X. and I. Greenwald, *Membrane topology of the C. elegans SEL-12 presenilin*. Neuron, 1996. **17**(5): p. 1015-21.
309. Li, X. and I. Greenwald, *Additional evidence for an eight-transmembrane-domain topology for Caenorhabditis elegans and human presenilins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 7109-14.

310. Thinakaran, G., et al., *Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo*. *Neuron*, 1996. **17**(1): p. 181-90.
311. Podlisy, M.B., et al., *Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue*. *Neurobiol Dis*, 1997. **3**(4): p. 325-37.
312. Ratovitski, T., et al., *Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(39): p. 24536-41.
313. Shah, S., et al., *Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor*. *Cell*, 2005. **122**(3): p. 435-47.
314. Lundkvist, J. and J. Naslund, *Gamma-secretase: a complex target for Alzheimer's disease*. *Curr Opin Pharmacol*, 2007. **7**(1): p. 112-8.
315. Edbauer, D., et al., *Reconstitution of gamma-secretase activity*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(5): p. 486-8.
316. Kimberly, W.T. and M.S. Wolfe, *Identity and function of gamma-secretase*. *J Neurosci Res*, 2003. **74**(3): p. 353-60.
317. Takasugi, N., et al., *The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex*. *Nature*, 2003. **422**(6930): p. 438-41.
318. Luo, W.J., et al., *PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(10): p. 7850-4.
319. Sisodia, S.S. and P.H. St George-Hyslop, *gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in?* *Nat Rev Neurosci*, 2002. **3**(4): p. 281-90.
320. Haass, C. and H. Steiner, *Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases*. *Trends Cell Biol*, 2002. **12**(12): p. 556-62.
321. Xu, M., et al., *gamma-Secretase: characterization and implication for Alzheimer disease therapy*. *Neurobiol Aging*, 2002. **23**(6): p. 1023-30.
322. Iwatsubo, T., *The gamma-secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis*. *Curr Opin Neurobiol*, 2004. **14**(3): p. 379-83.
323. St George-Hyslop, P.H., *Genetic factors in the genesis of Alzheimer's disease*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **924**: p. 1-7.
324. De Strooper, B., et al., *Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein*. *Nature*, 1998. **391**(6665): p. 387-90.
325. Herreman, A., et al., *Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(7): p. 461-2.
326. Herreman, A., et al., *Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(21): p. 11872-7.
327. Zhang, Z., et al., *Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(7): p. 463-5.
328. Esler, W.P., et al., *Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(7): p. 428-34.
329. Li, Y.M., et al., *Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1*. *Nature*, 2000. **405**(6787): p. 689-94.
330. Seiffert, D., et al., *Presenilin-1 and -2 are molecular targets for gamma-secretase inhibitors*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(44): p. 34086-91.
331. Evin, G., et al., *Aspartyl protease inhibitor pepstatin binds to the presenilins of Alzheimer's disease*. *Biochemistry*, 2001. **40**(28): p. 8359-68.
332. Parks, A.L. and D. Curtis, *Presenilin diversifies its portfolio*. *Trends Genet*, 2007. **23**(3): p. 140-50.
333. Selkoe, D.J., *Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(20): p. 11039-41.
334. Nunan, J., et al., *The C-terminal fragment of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor is degraded by a proteasome-dependent mechanism distinct from gamma-secretase*. *Eur J Biochem*, 2001. **268**(20): p. 5329-36.
335. Ling, Y., K. Morgan, and N. Kalsheker, *Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. **35**(11): p. 1505-35.
336. Evin, G., et al., *Alternative transcripts of presenilin-1 associated with frontotemporal dementia*. *Neuroreport*, 2002. **13**(6): p. 917-21.
337. Selkoe, D.J., *Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease*. *Nature*, 1999. **399**(6738 Suppl): p. A23-31.

338. Annaert, W., et al., *Presenilin function in APP processing*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **920**: p. 158-64.
339. Steiner, H. and C. Haass, *Intramembrane proteolysis by presenilins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(3): p. 217-24.
340. Cao, X. and T.C. Sudhof, *Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation*. J Biol Chem, 2004. **279**(23): p. 24601-11.
341. McLoughlin, D.M. and C.C. Miller, *The intracellular cytoplasmic domain of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein interacts with phosphotyrosine-binding domain proteins in the yeast two-hybrid system*. FEBS Lett, 1996. **397**(2-3): p. 197-200.
342. Borg, J.P., et al., *The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(11): p. 6229-41.
343. Cao, X. and T.C. Sudhof, *A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60*. Science, 2001. **293**(5527): p. 115-20.
344. Yamamoto, T. and M. Horikoshi, *Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60*. J Biol Chem, 1997. **272**(49): p. 30595-8.
345. Ikura, T., et al., *Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis*. Cell, 2000. **102**(4): p. 463-73.
346. Baek, S.H., et al., *Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein*. Cell, 2002. **110**(1): p. 55-67.
347. Wharton, K.A., et al., *Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats*. Cell, 1985. **43**(3 Pt 2): p. 567-81.
348. Blaumueller, C.M. and S. Artavanis-Tsakonas, *Comparative aspects of Notch signaling in lower and higher eukaryotes*. Perspect Dev Neurobiol, 1997. **4**(4): p. 325-43.
349. Logeat, F., et al., *The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8108-12.
350. Annaert, W. and B. De Strooper, *Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction*. Trends Neurosci, 1999. **22**(10): p. 439-43.
351. Brou, C., et al., *A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE*. Mol Cell, 2000. **5**(2): p. 207-16.
352. Schroeter, E.H., J.A. Kisslinger, and R. Kopan, *Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain*. Nature, 1998. **393**(6683): p. 382-6.
353. Fortini, M.E., *Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 673-84.
354. Fortini, M.E., *Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(5): p. 627-34.
355. Lai, E.C., *Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins*. EMBO Rep, 2002. **3**(9): p. 840-5.
356. Fryer, C.J., et al., *Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex*. Genes Dev, 2002. **16**(11): p. 1397-411.
357. Chen, H., et al., *Conservation of the Drosophila lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5355-60.
358. Egan, S.E., B. St-Pierre, and C.C. Leow, *Notch receptors, partners and regulators: from conserved domains to powerful functions*. Curr Top Microbiol Immunol, 1998. **228**: p. 273-324.
359. Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand, and R.J. Lake, *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development*. Science, 1999. **284**(5415): p. 770-6.
360. Kawamata, S., et al., *Overexpression of the Notch target genes Hes in vivo induces lymphoid and myeloid alterations*. Oncogene, 2002. **21**(24): p. 3855-63.
361. Iso, T., L. Kedes, and Y. Hamamori, *HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway*. J Cell Physiol, 2003. **194**(3): p. 237-55.
362. Ohsako, S., et al., *Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of Drosophila sensory organ formation*. Genes Dev, 1994. **8**(22): p. 2743-55.
363. Selkoe, D. and R. Kopan, *Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration*. Annu Rev Neurosci, 2003. **26**: p. 565-97.
364. Carpenter, G., *ErbB-4: mechanism of action and biology*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 66-77.

365. Buonanno, A. and G.D. Fischbach, *Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system*. *Curr Opin Neurobiol*, 2001. **11**(3): p. 287-96.
366. Yarden, Y., *The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities*. *Eur J Cancer*, 2001. **37 Suppl 4**: p. S3-8.
367. Ni, C.Y., et al., *gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase*. *Science*, 2001. **294**(5549): p. 2179-81.
368. Ni, C.Y., H. Yuan, and G. Carpenter, *Role of the ErbB-4 carboxyl terminus in gamma-secretase cleavage*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(7): p. 4561-5.
369. Lee, H.J., et al., *Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(8): p. 6318-23.
370. Sardi, S.P., et al., *Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain*. *Cell*, 2006. **127**(1): p. 185-97.
371. Schlessinger, J. and M.A. Lemmon, *Nuclear signaling by receptor tyrosine kinases: the first robin of spring*. *Cell*, 2006. **127**(1): p. 45-8.
372. Sartor, C.I., et al., *Her4 mediates ligand-dependent antiproliferative and differentiation responses in human breast cancer cells*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(13): p. 4265-75.
373. Long, W., et al., *Impaired differentiation and lactational failure of Erbb4-deficient mammary glands identify ERBB4 as an obligate mediator of STAT5*. *Development*, 2003. **130**(21): p. 5257-68.
374. Tidcombe, H., et al., *Neural and mammary gland defects in ErbB4 knockout mice genetically rescued from embryonic lethality*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(14): p. 8281-6.
375. Williams, C.C., et al., *The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone*. *J Cell Biol*, 2004. **167**(3): p. 469-78.
376. Arasada, R.R. and G. Carpenter, *Secretase-dependent tyrosine phosphorylation of Mdm2 by the ErbB-4 intracellular domain fragment*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(35): p. 30783-7.
377. Linggi, B. and G. Carpenter, *ErbB-4 s80 intracellular domain abrogates ETO2-dependent transcriptional repression*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(35): p. 25373-80.
378. Steinberg, M.S. and P.M. McNutt, *Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions*. *Curr Opin Cell Biol*, 1999. **11**(5): p. 554-60.
379. Gumbiner, B.M., *Regulation of cadherin adhesive activity*. *J Cell Biol*, 2000. **148**(3): p. 399-404.
380. Steinhilber, U., et al., *Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 4972-80.
381. Vallorosi, C.J., et al., *Truncation of the beta-catenin binding domain of E-cadherin precedes epithelial apoptosis during prostate and mammary involution*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(5): p. 3328-34.
382. Marambaud, P., et al., *A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions*. *Embo J*, 2002. **21**(8): p. 1948-56.
383. Polakis, P., *Wnt signaling and cancer*. *Genes Dev*, 2000. **14**(15): p. 1837-51.
384. Tulasne, D., et al., *Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(23): p. 10328-39.
385. Foveau, B., et al., *Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor*. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(4): p. 752-64.
386. Zeng, Q., Y.H. Tan, and W. Hong, *A single plasmid vector (pSTAR) mediating efficient tetracycline-induced gene expression*. *Anal Biochem*, 1998. **259**(2): p. 187-94.
387. Hays, J.L. and S.J. Watowich, *Oligomerization-dependent changes in the thermodynamic properties of the TPR-MET receptor tyrosine kinase*. *Biochemistry*, 2004. **43**(32): p. 10570-8.
388. Yang, J.Y. and C. Widmann, *Antiapoptotic signaling generated by caspase-induced cleavage of RasGAP*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(16): p. 5346-58.
389. Yang, J.Y., et al., *Partial cleavage of RasGAP by caspases is required for cell survival in mild stress conditions*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(23): p. 10425-36.
390. Benoit, V., et al., *Caspase-8-dependent HER-2 cleavage in response to tumor necrosis factor alpha stimulation is counteracted by nuclear factor kappaB through c-FLIP-L expression*. *Cancer Res*, 2004. **64**(8): p. 2684-91.
391. Green, K.A., et al., *Caspase-mediated Cleavage of Insulin Receptor Substrate*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(24): p. 25149-56.
392. Shewchuk, L.M., et al., *Structure of the Tie2 RTK domain: self-inhibition by the nucleotide binding loop, activation loop, and C-terminal tail*. *Structure*, 2000. **8**(11): p. 1105-13.

393. Yokoyama, N., et al., *The C terminus of RON tyrosine kinase plays an autoinhibitory role*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 8893-900.
394. Niu, X.L., K.G. Peters, and C.D. Kontos, *Deletion of the carboxyl terminus of Tie2 enhances kinase activity, signaling, and function. Evidence for an autoinhibitory mechanism*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 31768-73.
395. Bardelli, A., et al., *A peptide representing the carboxyl-terminal tail of the met receptor inhibits kinase activity and invasive growth*. J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 29274-81.
396. Wang, J.J., et al., *Dimerization-dependent block of the proapoptotic effect of p75(NTR)*. J Neurosci Res, 2000. **60**(5): p. 587-93.
397. Paumelle, R., et al., *Sequential activation of ERK and repression of JNK by scatter factor/hepatocyte growth factor in madin-darby canine kidney epithelial cells*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(11): p. 3751-63.
398. Xia, Z., et al., *Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis*. Science, 1995. **270**(5240): p. 1326-31.
399. Llambi, F., et al., *The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase*. Embo J, 2005. **24**(6): p. 1192-201.
400. Schaaf, C.P., et al., *Novel interaction partners of the TPR/MET tyrosine kinase*. Faseb J, 2005. **19**(2): p. 267-9.
401. Tulasne, D. and B. Foveau, *The shadow of death on the MET tyrosine kinase receptor*. Cell Death Differ, 2007.
402. Meng, X.W., S.H. Lee, and S.H. Kaufmann, *Apoptosis in the treatment of cancer: a promise kept?* Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(6): p. 668-76.
403. Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman, *Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer*. Ann Hematol, 2005. **84**(10): p. 627-39.
404. Tikhomirov, O. and G. Carpenter, *Identification of ErbB-2 kinase domain motifs required for geldanamycin-induced degradation*. Cancer Res, 2003. **63**(1): p. 39-43.
405. Tikhomirov, O., M. Dikov, and G. Carpenter, *Identification of proteolytic fragments from ErbB-2 that induce apoptosis*. Oncogene, 2005. **24**(24): p. 3906-13.
406. Cuello, M., et al., *Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2*. Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4892-900.
407. Munster, P.N., et al., *Degradation of HER2 by ansamycins induces growth arrest and apoptosis in cells with HER2 overexpression via a HER3, phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT-dependent pathway*. Cancer Res, 2002. **62**(11): p. 3132-7.
408. Smith, V., et al., *ErbB2 overexpression in an ovarian cancer cell line confers sensitivity to the HSP90 inhibitor geldanamycin*. Anticancer Res, 2002. **22**(4): p. 1993-9.
409. Galvani, A.P., et al., *Suramin modulates cellular levels of hepatocyte growth factor receptor by inducing shedding of a soluble form*. Biochem Pharmacol, 1995. **50**(7): p. 959-66.
410. Nath, D., et al., *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, 2001. **114**(Pt 6): p. 1213-20.
411. Wajih, N., J. Walter, and D.C. Sane, *Vascular origin of a soluble truncated form of the hepatocyte growth factor receptor (c-met)*. Circ Res, 2002. **90**(1): p. 46-52.
412. Pozner-Moulis, S., D.J. Pappas, and D.L. Rimm, *Met, the hepatocyte growth factor receptor, localizes to the nucleus in cells at low density*. Cancer Res, 2006. **66**(16): p. 7976-82.
413. Hundhausen, C., et al., *The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1186-95.
414. Petrelli, A., et al., *Ab-induced ectodomain shedding mediates hepatocyte growth factor receptor down-regulation and hampers biological activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(13): p. 5090-5.
415. Zhang, Y., et al., *Growth hormone (GH)-induced dimerization inhibits phorbol ester-stimulated GH receptor proteolysis*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 24565-73.
416. Alele, J., et al., *Blockade of growth hormone receptor shedding by a metalloprotease inhibitor*. Endocrinology, 1998. **139**(4): p. 1927-35.
417. Guan, R., et al., *Phorbol ester- and growth factor-induced growth hormone (GH) receptor proteolysis and GH-binding protein shedding: relationship to GH receptor down-regulation*. Endocrinology, 2001. **142**(3): p. 1137-47.

418. Zhang, Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) is a growth hormone binding protein (GHBP) sheddase: the metalloprotease TACE/ADAM-17 is critical for (PMA-induced) GH receptor proteolysis and GHBP generation.* *Endocrinology*, 2000. **141**(12): p. 4342-8.
419. Okamoto, I., et al., *Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway.* *J Cell Biol*, 2001. **155**(5): p. 755-62.
420. Marambaud, P., et al., *A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations.* *Cell*, 2003. **114**(5): p. 635-45.
421. Grbovic, O.M., et al., *Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and Abeta production.* *J Biol Chem*, 2003. **278**(33): p. 31261-8.
422. Gupta-Rossi, N., et al., *Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor.* *J Cell Biol*, 2004. **166**(1): p. 73-83.
423. Urra, S., et al., *TrkA receptor activation by nerve growth factor induces shedding of the p75 neurotrophin receptor followed by endosomal gamma-secretase-mediated release of the p75 intracellular domain.* *J Biol Chem*, 2007. **282**(10): p. 7606-15.
424. Pasternak, S.H., et al., *Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane.* *J Biol Chem*, 2003. **278**(29): p. 26687-94.
425. Athauda, G., et al., *c-Met ectodomain shedding rate correlates with malignant potential.* *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(14 Pt 1): p. 4154-62.
426. Rao, P. and T. Kadesch, *The intracellular form of notch blocks transforming growth factor beta-mediated growth arrest in Mv1Lu epithelial cells.* *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(18): p. 6694-701.
427. Shih le, M. and T.L. Wang, *Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy.* *Cancer Res*, 2007. **67**(5): p. 1879-82.