



HAL
open science

Implication du récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) MET sur la balance survie/apoptose et identification de nouvelles mutations de RTKs dans les cancers colorectaux métastatiques

Leslie Duplaquet

► **To cite this version:**

Leslie Duplaquet. Implication du récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) MET sur la balance survie/apoptose et identification de nouvelles mutations de RTKs dans les cancers colorectaux métastatiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2018. Français. NNT : 2018LILUS031 . tel-02078769

HAL Id: tel-02078769

<https://theses.hal.science/tel-02078769>

Submitted on 25 Mar 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Lille – Ecole Doctorale Biologie - Santé
Institut de Biologie de Lille, UMR8161, Institut Pasteur de Lille

THESE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Lille

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Biologie cellulaire

Présentée par

Leslie DUPLAQUET

*Implication du récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) MET
sur la balance survie/apoptose et identification de nouvelles
mutations de RTKs dans les cancers colorectaux métastatiques*

Soutenue le 20 décembre 2018 devant la commission d'examen :

Président : Pr. Tony LEFEBVRE (Université de Lille)
Rapporteurs : Dr. Catherine BRENNER (Université de Paris)
Pr. Agnès BERNET (Université de Lyon)
Examineur : Dr. Stéphanie KERMORGANT (London University)
Directeur de thèse : Dr. David TULASNE (Université de Lille)
Co-encadrant : Dr. Alessandro FURLAN (Université de Lille)

« Toute avancée des connaissances génère autant d'interrogations qu'elle apporte de réponses. »

Pierre Joliot-Curie (1932-)
Extrait du livre *La recherche passionnément.*

Implication du récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) MET sur la balance survie/apoptose et identification de nouvelles mutations de RTKs dans les cancers colorectaux métastatiques

Résumé :

Les RTKs sont impliqués dans le dialogue au sein des tissus par la régulation de nombreuses réponses cellulaires dont la survie, la prolifération ou la mobilité. Dans les cancers, ces récepteurs sont fréquemment dérégulés notamment par des mutations activatrices. Ainsi, la suractivation des RTKs induit la transformation cellulaire et la tumorigenèse en favorisant par exemple la survie cellulaire. Depuis le début des années 2000, le développement de molécules inhibitrices de l'activité tyrosine kinase (TKI) et d'anticorps bloquant l'interaction ligand/récepteur ont montré que les RTKs représentent des cibles thérapeutiques majeures dans le traitement des cancers.

MET est un RTK exprimé par les cellules épithéliales, dont le ligand est l'Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF). En plus de son rôle pro-survie, MET peut également favoriser l'apoptose en absence de ligand et sous l'effet d'un stress. MET est alors clivé par les caspases et libère dans le cytosol un fragment de 40 kDa nommé p40MET. Ce fragment active la voie intrinsèque de l'apoptose en causant la perméabilisation des mitochondries. Cependant, les mécanismes moléculaires responsables de cette perméabilisation et l'impact physiologique de la fonction pro-apoptotique de MET étaient encore inconnus.

Mon travail de thèse a permis de démontrer que le fragment p40MET se localise dans la région des MAMs, constituant l'interface entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries, où il favorise un transfert de calcium entre les deux organites. Ce transfert déclenche une surcharge de calcium dans les mitochondries, responsable de leur perméabilisation. De plus, nous avons développé une lignée de souris transgéniques dans lesquelles MET est muté sur l'un des sites caspases. Ces souris sont incapables de produire le fragment p40MET pro-apoptotique. Ce modèle nous a permis de démontrer l'importance du clivage de MET dans l'amplification de l'apoptose *in vivo*. Ainsi, nos travaux apportent les premières preuves de la fonction de MET en tant que récepteur à dépendance au sein d'un organisme et décrivent un nouveau mécanisme de signalisation pro-apoptotique par la dérégulation des flux calciques.

Ces dernières années, la découverte de mutations touchant les RTKs dans les cancers a augmenté de façon exponentielle. Toutefois, pour une grande majorité de mutations, leurs conséquences fonctionnelles sont totalement inconnues. Ainsi, en parallèle de mon principal sujet de thèse nous avons évalué la pertinence biologique et clinique des mutations de RTK identifiées par séquençage

haut débit à partir d'échantillons de patients. Le séquençage de tissus sains, de tumeurs colorectales et de métastases hépatiques de 30 patients a permis d'identifier de nombreuses mutations somatiques. Parmi elles, certaines affectent le domaine kinase des récepteurs et sont présentes à la fois dans les tumeurs et les métastases. L'analyse fonctionnelle que j'ai menée sur 7 de ces mutations révèle qu'elles ne provoquent ni la suractivation de la kinase ni la transformation des fibroblastes NIH3T3. Au contraire, deux mutations de RTKs provoquent une inhibition drastique de leur activité kinase. Ces résultats démontrent que ces variants de RTK ne sont pas des cibles appropriées pour l'utilisation de TKI à des fins thérapeutiques et démontre l'intérêt de coupler la recherche de variants à des études fonctionnelles.

En conclusion, ce travail ouvre des pistes de réflexion quant au ciblage thérapeutique des RTKs dans les cancers. D'une part, les capacités pro-apoptotiques de certains RTKs constituent sans doute un frein à la tumorigenèse, et leurs stimulations pourraient renforcer l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses. D'autre part, la présence de mutations dans le domaine kinase des RTKs ne conduit pas nécessairement à la suractivation du récepteur. Les nombreuses altérations moléculaires des RTKs dans les cancers ne constituent donc pas autant de cibles thérapeutiques que ce que nous pourrions espérer.

Involvement of the receptor tyrosine kinase (RTK) MET on the survival/apoptosis balance and identification of new RTKs mutations in metastatic colorectal cancers

Abstract:

RTKs are involved in tissue dialogue by regulating many cellular mechanisms such as survival, proliferation or mobility. In cancers, these receptors are frequently deregulated, as a result of various molecular alterations leading to their activation. RTKs overactivation induces cell transformation and tumorigenesis notably by promoting survival. Since the early 2000s, the development of tyrosine kinase inhibitors (TKI) demonstrated that RTKs represent major therapeutic targets in cancer treatment.

MET receptor and its ligand the Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF) are known to promote survival of many epithelial structures during embryogenesis and later during adulthood. Besides pro-survival role of the ligand-activated MET, the receptor is also able to promote apoptosis, which has led to classify it within the dependence receptor family. Indeed, in absence of its ligand and under stress conditions, MET is cleaved by caspases leading to the production of an intracellular fragment of nearly 40 kDa named p40MET able to amplify apoptosis. This fragment activates the intrinsic pathway of apoptosis by causing mitochondrial permeabilization. However, the molecular mechanisms involved in this permeabilization and the physiological impact of the pro-apoptotic function of MET were still unknown.

My PhD work has evidenced p40MET localization at the MAM microdomain and characterized a calcium transfer from the endoplasmic reticulum to the mitochondria triggered by p40MET. This calcium transfer triggers a calcium overload in mitochondria leading to their membrane permeabilization and apoptosis. In addition, we engineered a knock-in mouse model expressing mutated MET at the C-terminal caspase site. These mice are unable to produce the pro-apoptotic p40MET fragment. This model allowed us to assess the importance of MET cleavage in physiological apoptosis *in vivo*. Altogether, our work brings the first evidence for MET function as a dependence receptor in an organism and demonstrates a new signaling mechanism involved in apoptosis amplification by p40MET through calcium flux deregulation. This process may be relevant in the physio-pathology of organs where MET is expressed.

In recent years, the discovery of mutations affecting RTKs in cancers has increased exponentially. However, for a large majority of mutations, their functional consequences are totally unknown. Thus, in parallel of my main thesis topic, we evaluated the biological and clinical relevance of RTKs mutations identified by high throughput sequencing from patient samples. Sequencing of healthy tissues, colorectal tumours and liver metastases of 30 patients has identified many somatic mutations. Some

of them affect the receptor kinase domain and are present in both tumors and metastases. Functional analysis of 7 of these mutations shows that they do not cause neither kinase overactivation nor transformation of NIH3T3 fibroblasts. On the contrary, two RTK mutations cause drastic inhibition of the corresponding kinase activity. These findings indicate that these RTK variants are not suitable targets for TKI. Therefore, it appears important to set up reliable functional assays to interpret identified variants and classify them as pathogenic or neutral.

In conclusion, my work opens up new perspectives on therapeutic strategies targeting RTKs in cancers. First of all, the pro-apoptotic capacities of some RTKs are undoubtedly a brake to tumorigenesis, and their stimulations could reinforce the effectiveness of anti-cancer therapies. On the other hand, we have shown that RTKs mutations in the kinase domain do not necessarily lead to overactivation of the receptor suggesting that they are probably not involved in tumorigenesis and that treatment with TKIs targeting them would be ineffective. This functional information could notably influence the choice of a suitable targeted therapy.

Remerciements

Et voilà le point final d'une aventure qui aura duré 3 ans. Une belle aventure qui m'a permis, petit à petit, de prendre confiance en ce que je faisais, de développer mon esprit critique et de mener à bien un projet scientifique ; tout cela aux côtés de personnes formidables.

Pour commencer j'aimerais remercier mes deux encadrants de thèse, David Tulasne et Alessandro Furlan. Sans eux il est certain que je ne serais pas allée bien loin.

David, merci pour votre disponibilité, votre écoute, vos conseils et surtout pour l'enthousiasme dont vous avez fait preuve à chaque résultat obtenu. Cela m'a permis de ne jamais baisser les bras. Vous avez beaucoup de personnes à encadrer mais pourtant j'ai toujours pu vous demander de l'aide dès que j'en avais besoin. Merci aussi de m'avoir soutenue dans tous mes projets, y compris dans mon souhait de faire du monitorat. J'espère que vous m'avez vu évoluer positivement au travers des manips, des écrits et des oraux.

Alessandro, merci de m'avoir pris sous ton aile, de m'avoir tout appris. Je sais que j'ai eu beaucoup de chance d'avoir eu l'aide et les nombreux conseils d'un post-doctorant aguerri tout au long de ma thèse, que ce soit au niveau technique, stratégique et personnel. Ta bienveillance, ta confiance et tes connaissances impressionnantes m'ont permis d'avancer bien plus vite que je ne l'aurais imaginé. Tu laisseras une trace indélébile dans ma façon de travailler. J'espère que tu seras fier de ton padawan.

Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements au Pr. Tony Lefebvre, au Pr. Agnès Bernet, au Dr. Catherine Brenner et au Dr. Stéphanie Kermogant de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse et de l'intérêt qu'ils portent à mon travail.

Je tiens ensuite à exprimer toute ma gratitude envers l'équipe Signal.

Un grand merci à Audrey, tu auras révolutionné ma fin de thèse avec un Blot migré et transféré en moins de 2 h. Merci pour ton soutien précieux tout au long de ma thèse, surtout à la fin car il m'a permis d'écrire mon manuscrit avec plus de sérénité. Et surtout merci d'avoir été là, avec David, pour les manips animales.

Merci à Catherine, pour ta patience et ton aide précieuse quand j'ai débarqué dans l'équipe. J'ai aussi pu trouver en toi une personne très attentive et attachante avec qui j'ai pu parler de tout.

Merci à tous les chercheurs et cliniciens de l'équipe, Zoulika Kherrouche, Fabrice Lejeune, Alexis Cortot et Marie-Christine Copin pour vos conseils avisés pendant les réunions d'équipe. J'aimerais adresser une pensée plus particulière à Zou pour ses discussions décompressantes à midi et pour sa franchise inégalable qui m'a parfois bien fait rire.

Plus que des collègues j'ai pu trouver de véritables amis dans cette équipe. Des amis qui ont rendu la vie au laboratoire très agréable et amusante, je n'ai vraiment pas vu le temps passer avec vous. Des amis toujours prêts à m'aider, à me booster et à m'encourager ! Marie, tu as été une très belle rencontre et j'espère vraiment que nous aurons l'occasion de retravailler ensemble un jour. Je crois qu'il n'y a pas un jour où tu ne m'as pas fait rire par tes questions scientifiques loufoques ou tes idées farfelues (« la pensée du jour »). J'espère vraiment que la chance finira par te sourire à nouveau car tu le mérites amplement. Hana, mon premier acolyte de labo, je n'oublierai pas tous les moments passés ensemble. Tu m'as beaucoup manqué dans ma dernière année. Mélanie, j'ai adoré la période où nous avons travaillé ensemble car elle m'a permis de découvrir une personne très attachante et bienveillante. Merci à la team Serpentard, Angela, Santiago, Carole, malgré les a priori sur notre maison vous êtes des personnes merveilleuses. Santiago, promis ce n'est vraiment pas moi qui t'ai laissé ce message vocal !

Un grand merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer dans l'équipe qui ont grandement contribué à la bonne ambiance générale, Philippe, Samira, Marie L, Sonia, Simon, Elise et Charbel.

J'ai également une pensée chaleureuse pour Sarah, mon binôme de thèse. On a affronté toutes les étapes ensemble et je pense que ça nous a bien rapproché. Tu es une personne vraiment extraordinaire, et je pense que le mot est bien choisi. J'espère, ou plutôt je suis sûre, que tu feras une thèse exemplaire car tu le mérites vraiment par tout le travail que tu as fourni. Ne me nargue pas trop quand tout ça sera derrière toi 4 jours avant moi.

Je souhaite aussi adresser tous mes encouragements et mon soutien à tous les doctorants de l'unité encore en course.

Ce fut vraiment un grand bonheur pour moi de travailler aux côtés des membres de l'UMR8161. Une unité composée de personnes vraiment généreuses et j'ai pu moi-même en faire l'expérience par les nombreux dons que vous m'avez transmis quand ma famille en a eu besoin. J'ai vraiment été touchée par votre bienveillance. Merci plus particulièrement aux personnes avec qui j'ai le plus discuté et partagé, Ingrid, Vanessa, Erwan, Amélie, Souhila, Clara, Céline et Alexandre.

J'aimerais aussi remercier tous mes amis de longue date, qui m'ont éloigné le temps de quelques heures de ma thèse. Des amis qui ont toujours été là pour moi, et ce depuis déjà 10 ans, voire plus ; Anas, Marieke, Christophe, Mathilde, Gaëtan et Adeline. Je prends vraiment beaucoup de plaisir à passer du temps avec vous, vivement Septembre ! Je pense aussi à mes amis de FAC, dans la même galère que moi.

Un énorme merci à ma famille. J'ai une chance énorme de vous avoir et vous comptez tous énormément pour moi. J'ai une pensée plus particulière pour mes parents, merci de m'avoir aidé, soutenu et encouragé tout au long de mes études et on peut dire que j'en ai eu besoin. J'espère que vous trouverez dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de vos efforts et que vous en serez fier.

Pour clore ce préambule j'aimerais remercier tout particulièrement une personne très importante pour moi, une personne avec qui je partage ma vie depuis maintenant 8 ans. Maxence, sans toi je ne me serais probablement jamais engagé sur le chemin de la thèse, un chemin que nous avons finalement parcouru tous les deux. Merci pour ton soutien indéfectible, pour le bonheur que tu m'apportes au quotidien, pour tout.

Publications

Article scientifiques :

- **Duplaquet L**, Figeac M, Leprêtre F, Frandemiche C, Villenet C, Sebda S, Sarafan-Vasseur N, Bénozène M, Vincent A, Goormachtigh G, Wicquart L, Rousseau N, Beaussire L, Truant S, Michel P, Sabourin JC, Galateau-Sallé F, Copin MC, Zalcman G, De Launoit Y, Fafeur V and Tulasne D. Functional analysis of somatic mutations affecting receptor tyrosine kinase in metastatic colorectal cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* (en révision)
- **Duplaquet L**, Leroy C, Vincent A, Lefebvre J, Vanden Abeele F, Lancel S, Giffard F, Bidaux G, Héliot L, Poulain L, Furlan A and Tulasne D. MET dependence receptor controls hepatocyte sensitivity to apoptosis through Ca²⁺ flux regulation. *Cell Death and Differentiation* (en révision)

Revue :

- **Duplaquet L**, Kherrouche Z, Baldacci S, Jamme P, Cortot AB, Copin MC, Tulasne D. The multiple ways leading to MET receptor addiction in cancer. *Oncogene* volume 37, pages 3200–3215 (2018)

Présentations orales :

- EMBO Workshop “Mitochondria, Apoptosis and Cancer”, Bled, Slovenia (septembre 2017)
The dark side of MET receptor: Impact on survival-apoptosis balance *in vivo*
Obtention d'une bourse de voyage par EMBO
- Journée André Verbert, Lille, France (septembre 2017)
The dark side of MET receptor: Impact on survival-apoptosis balance *in vivo*
Obtention du 1^{er} prix de présentation orale
- 10^{ème} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, France (mai 2017)
La face cachée du récepteur MET : Impact sur la balance survie-apoptose *in vivo*
Obtention du 2^{ème} prix de présentation orale

Présentation poster :

- 11^{ème} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, France (mai 2018)
Analyse fonctionnelle de nouvelles mutations affectant les récepteurs à activité tyrosine kinase dans les cancers colorectaux métastatiques
Obtention du 3^{ème} prix poster
- 4th EACR conference : A matter of Life or Death, Amsterdam, Netherlands (février 2018)
MET receptor's dark side : Impact on survival/apoptosis balance *in vivo*
- 9^{ème} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, France (mai 2016)
Le clivage du récepteur Met par les caspases contrôle la balance survie-apoptose de progéniteurs hépatiques : vers une implication du réticulum endoplasmique ?

Table des matières

Table des matières	12
Abréviations	14
Index des figures et tableaux	16
Avant-propos.....	19
Introduction.....	21
I – Les récepteurs membranaires	23
A – La grande famille des récepteurs à activité tyrosine kinase	23
A.1. Caractéristiques des RTKs	23
A.2. Les différentes familles	23
A.3. RTKs et cancer	25
B – Les récepteurs à dépendance, des récepteurs à deux visages.....	26
B.1. Caractéristiques des récepteurs à dépendance	26
B.2. Récepteurs à dépendance et cancer	28
B.3. Potentiel thérapeutique	30
II – Le récepteur MET	32
A – La signalisation du récepteur MET	32
A.1. Les premières découvertes	32
A.2. Les rôles du couple HGF-MET	35
A.3. Les cascades de signalisation	38
A.4. Régulation du récepteur	45
B – Les différents types de dérégulation du couple HGF/SF-MET dans les cancers	50
B.1. Les mutations du récepteur MET	50
B.2. La surexpression de MET	54
B.3. L'amplification de MET	55
B.4. La surexpression du ligand	57
B.5. Les réarrangements chromosomiques.....	58
C – Les stratégies thérapeutiques	59
C.1. Les inhibiteurs du domaine kinase de MET ou multi-kinase.....	59
C.2. Les anticorps bloquants dirigés contre MET ou l'HGF	61
C.3. Les molécules antagonistes de MET ou de l'HGF.....	62
C.4. Vers l'addiction au récepteur MET.....	63
III – Le processus d'apoptose	65

A – Caractéristiques de l’apoptose.....	65
A.1. Généralités	65
A.2. Les caspases	65
B – Les voies d’induction de l’apoptose	67
B.1. La voie extrinsèque : L’apoptose par les récepteurs membranaires	67
B.2. La voie intrinsèque : l’apoptose par la mitochondrie	69
C – Le contrôle de l’induction de l’apoptose.....	73
C.1. Régulation de l’activation des caspases	73
C.2. Le rôle de la famille BCL-2	74
C.3. Echanges calciques et apoptose : l’implication des MAMs.....	77
D – Apoptose et cancer	82
D.1. Les mécanismes de résistance à l’apoptose	82
D.2. Stratégies thérapeutiques.....	84
Objectifs de la thèse	87
Résultats	89
I. La face cachée du récepteur MET : Impact sur la balance survie/apoptose <i>in vivo</i>	91
1. Contexte de l’étude	91
2. Résumé de l’étude.....	91
3. Résultats complémentaires.....	93
4. Discussion	98
II. Mutation des RTK dans les cancers colorectaux à métastases hépatiques	112
1. Contexte de l’étude	112
2. Résumé de l’étude.....	112
3. Discussion	115
Conclusion	123
Références.....	127

Abréviations

ADAM : a disintegrin and metalloproteinase	DIABLO : direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low Pi
AIF : apoptosis-inducing fragment	DISC : death-inducing signalling complex
AKT : du nom d'un oncogene viral	DRP1 : dynamin-related protéin1
ALK : anaplastic lymphoma kinase	EGF(R) : epidermal growth factor (receptor)
ANT : adenine nucleotide translocase	eIF2 α : eukaryotic translation initiation factor 2 α
APAF-1 : apoptotic protease activating factor 1	EMV : endosomes multivésiculaires
APC : adenomatous polyposis coli	EPH : Récepteur aux Ephrins
ATF6 : activating transcription factor 6	ERBB : Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase
BAD : BCL2-associated agonist of cell death	ERK : extracellular signal-regulated kinase
BCL : follicular B cell lymphomas	FACI4 : fatty acid-CoA ligase 4
BH : BCL-2 homology	FADD : Fas associated protein via death domain
BIR : baculovirus IAP repeat	Fas : Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6
CARD : caspase recruitment domain	FGF(R) : fibroblast growth factor (receptor)
Caspases : cysteinyl aspartate-cleaving proteases	FISH : Fluorescence in situ hybridization
CBL : Casitas B-cell Lineage	FLIP : Fas-associated death domain protein
CBNPC : cancers bronchiques non à petites cellules	FRET : transfert d'énergie par résonance de type Förster
CCR : cancer colorectal	GAB1 : GRB2-Associated Binder1
CGH : comparative genomic hybridization	GGA3 : golgi-localized γ -ear-containing Arf-binding protein3
CHOP : CCAAT enhancer-binding protein homologous protein	GRP75/78 : glucose-regulated protein 75/78
COSMIC : catalogue of somatic mutations in cancer	GSK3 : Glycogen synthase kinase 3
Crk : CT10 regulator kinase	HGF/SF : hepatocyte growth factor/scatter factor
CytC : Cytochrome C	IAP : inhibitor of apoptosis proteins
DAPK1 : Death-associated protein kinase	Ig : Immunoglobulin-like
DCC : deleted in colorectal cancer	IHC : Immuno-histo-chimie
DD : death domain	IMM : inner mitochondrial membrane
DDR : Discoidin domain-containing receptor	IMS : inter-membrane space
DED : death effector domain	

IP3R : inositol-1,4,5-tris-phosphate receptor

IPT : Immunoglobulin-like region in Plexin and Transcription factors

IRE1 : inositol requiring enzyme 1

KI : knock-in

KO : knock-out

MAM : mitochondrial associated ER membrane

MAPK : mitogene-activated protein kinase

MBD : MET binding domain

MBS : MET binding site

MCU : mitochondrial calcium channel uniporter

MDM2 : murine double-minute p53 binding protein

MFN : mitofusine

MOMP : mitochondrial outer membrane permeabilization

mPTP : mitochondrial permeability transition pore

mT2 : mTurquoise2

NGS : next-generation sequencing

OMM : outer mitochondrial membrane

PARP : poly(ADP-ribose) polymérase

PERK : PRK-like ER kinase

PI3K : phosphoinositide-3 kinase

PKC : protéine kinase C

PLC : phospho lipase C

PPS1/2 : phosphatidylsérine synthase 1/2

PSI : Plexin Semaphorin Integrin domain

PS-RIP : presenilin-regulated intramembrane proteolysis

PTB : phosphotyrosine binding

PTP : protéines tyrosine phosphatase

PTPRZ1 : receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta

RAS : Rat sarcoma virus

RE : réticulum endoplasmique

RET : rearranged during transfection

ROS : reactive oxygen species

RTK : Récepteur à activité tyrosine kinase

SEMA : domaine homologue du domaine des sémaphorines

SH : Src homogy domain

SHC : SH2 domain-containing transforming protein

SMAC : second mitochondria-derived activator of caspase

SOS : son of the sevenless

SPH : serine protease homology domain

SRC : sarcome proto-oncogene

STAT3 : signal transducer and activator of transcription 3

SYFP2 : Super Yellow Fluorescent Protein 2

TKI : inhibiteur de tyrosine kinase

TNF(R) : Tumor necrosis factor (receptor)

TOM : translocase of the outer membrane

TPR : translocated promoter region

TRADD : TNFR1-associated death domain protein

TRIAD1 : RING fingers and DRIL1

UNC5H : uncoordinated gene 5H

UPR : unfolded protein response

VDAC : voltage dependant anion channel

VEGF(R) : vascular endothelial growth factor (receptor)

Index des figures et tableaux

Figures :

- Figure 1** : Organisation structurale des 20 familles de RTKs
- Figure 2** : La famille des récepteurs à dépendance
- Figure 3** : Exemples de la signalisation pro-apoptotique des récepteurs à dépendance
- Figure 4** : Structure du récepteur MET
- Figure 5** : Structure de l'HGF/SF
- Figure 6** : Structure cristallographique des liaisons entre l'HGF/SF et MET
- Figure 7** : Implication du couple HGF/SF-MET au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte

- Figure 8** : Cascades de signalisation et réponses biologiques induites par l'activation du récepteur MET

- Figure 9** : Représentation schématique de la protéine GAB1
- Figure 10** : Représentation schématique de protéines à domaine SH2
- Figure 11** : L'internalisation du récepteur MET : Signalisation, recyclage à la membrane et dégradation

- Figure 12** : MET fait partie de la famille des récepteurs à dépendance
- Figure 13** : Les différentes mutations de MET répertoriées chez l'Homme
- Figure 14** : Représentation schématique des différentes altérations moléculaires induisant l'activation du récepteur MET

- Figure 15** : Représentation schématique des stratégies d'inhibition de MET
- Figure 16** : Structure et mode d'activation des caspases
- Figure 17** : Schéma des deux voies d'induction de l'apoptose
- Figure 18** : Structure de la mitochondrie
- Figure 19** : Vue d'ensemble des interactions entre les différents membres de la famille BCL-2
- Figure 20** : Les protéines situées à la jonction RE-mitochondries
- Figure 21** : Les stratégies thérapeutiques visant à favoriser l'apoptose
- Figure 22** : Alignement des protéines de type BH3-only et BH3-like avec les séquences de p40MET murin et humain
- Figure 23** : Mesures de l'apoptose induite par le fragment p40MET-LD muté sur le site BH3-like
- Figure 24** : Validation des vecteurs exprimant la protéine p40MET-LD marquée m-Turquoise2 ou SYFP2
- Figure 25** : Analyse par RT-qPCR des facteurs impliqués dans les voies PERK et ATF6 du stress du RE
- Figure 26** : Proposition du rôle du clivage C-terminal de MET dans la régulation de la balance survie/apoptose
- Figure 27** : Proposition du rôle du complexe MET/FAS dans la régulation de la balance survie/apoptose
- Figure 28** : Stratégies expérimentales pour étudier le potentiel rôle de MET en tant que suppresseur de tumeur
- Figure 29** : Stratégies pouvant favoriser la production de p40MET dans des cas de cancers où MET est suractivé

- Figure 30** : Production du fragment p40MET sur une lignée cellulaire cancéreuse avec amplification de MET
- Figure 31** : Comparaison de la répartition des mutations somatiques sur la séquence des récepteurs ERBB4 et MET
- Figure 32** : Effet de la mutation inactivatrice de la protéine BRAF dans la suractivation de la voie ERK

Tableau :

- Tableau 1** : Alignement des sites de clivage par les caspases de MET chez différentes espèces

Avant-propos

La communication entre les cellules et leur environnement est indispensable pour le bon fonctionnement d'un organisme. Par conséquent, les cellules expriment à leur surface une grande variété de protéines qui vont permettre le transfert d'informations du milieu extérieur vers l'intérieur de la cellule. Parmi elles on discerne les récepteurs membranaires qui vont détecter les signaux extérieurs et les transmettre à la cellule. Ces informations, qui peuvent être synergiques ou au contraire divergentes, vont influencer le devenir de la cellule. Les réponses cellulaires induites sont multiples et conduisent par exemple à la survie, la prolifération, la migration, ou encore à la mort de la cellule.

Il existe différents types de récepteurs membranaires, les récepteurs sans activité enzymatique, tels que les récepteurs couplés aux protéines G ou encore les canaux calciques, et les récepteurs à activité enzymatique, comme les récepteurs à activité tyrosine kinase ou les récepteurs à activité sérine/thréonine kinase. Au cours de ma thèse, je me suis focalisée sur l'étude des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) dont la signalisation est fréquemment dérégulée dans les cancers et qui représentent des cibles thérapeutiques majeures.

Dans un premier temps, je me suis intéressée au récepteur MET qui a la particularité de faire également partie de la famille des récepteurs à dépendance car il est capable, en fonction du contexte cellulaire et environnemental, d'émettre des signaux de survie ou à l'inverse des signaux favorisant la mort cellulaire par apoptose. Le but de cette étude est de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'activité pro-apoptotique du récepteur et d'évaluer son implication sur la balance survie/apoptose au sein d'un organisme.

Dans un deuxième temps, j'ai caractérisé les conséquences fonctionnelles de 7 mutations localisées sur 6 RTKs distincts (EPHA4, EPHB2, KIT, TrkB, FGFR4 et FLT4/VEGFR3) identifiées chez des patients atteints de cancers colorectaux à métastases hépatiques. Le but de cette étude est d'interpréter la pertinence biologique et clinique de ces mutations afin d'attribuer aux patients des thérapies ciblées efficaces.

Introduction

I – Les récepteurs membranaires

A – La grande famille des récepteurs à activité tyrosine kinase

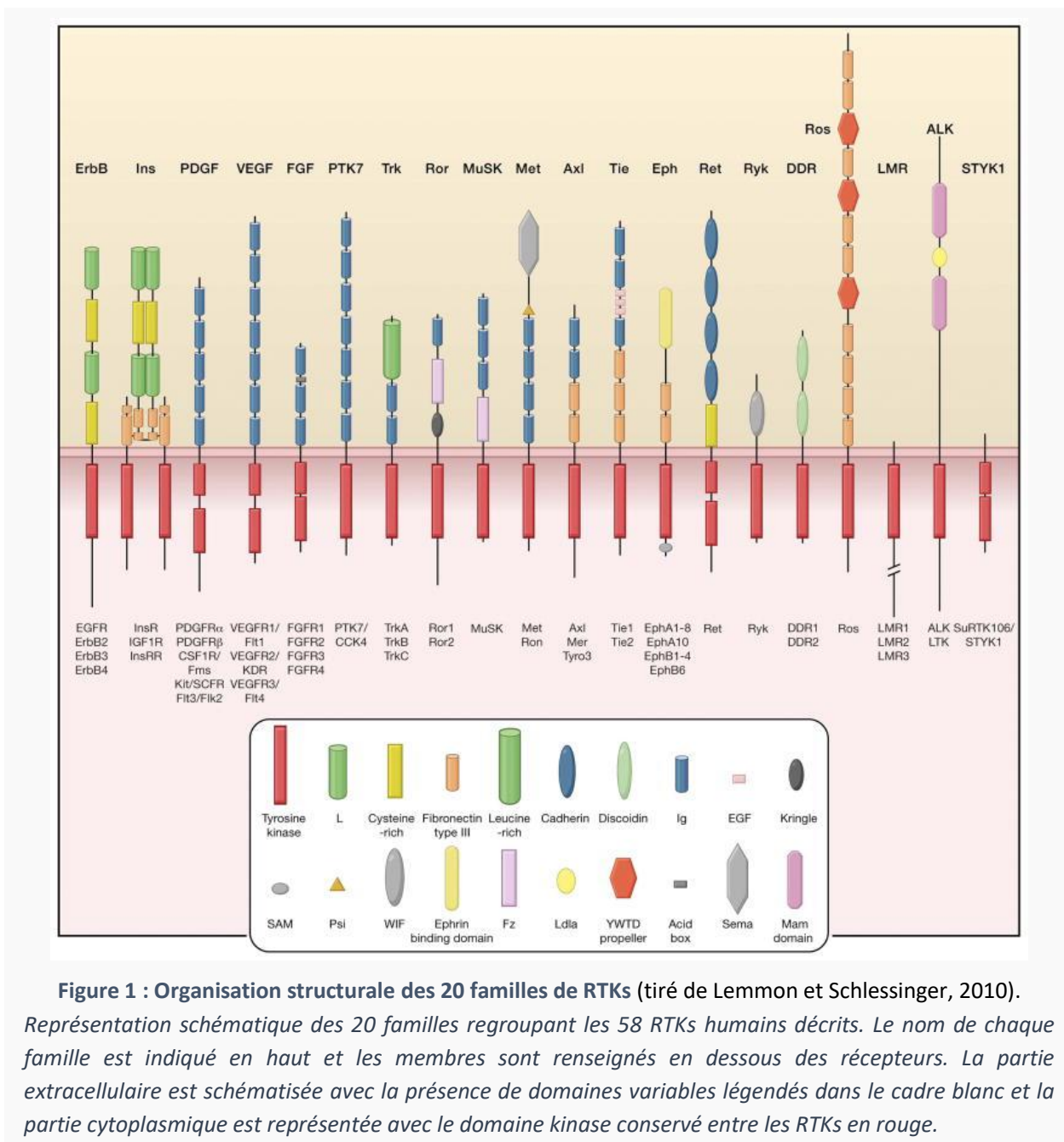
A.1. Caractéristiques des RTKs

Aujourd'hui on dénombre 58 récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) regroupés selon leur organisation structurale en 20 familles (Robinson et al., 2000). Tous ces récepteurs ont une structure globale et des mécanismes d'activation relativement similaires. Les RTKs sont des glycoprotéines transmembranaires composées d'une région extracellulaire, comportant le site de liaison pour son ligand, une région transmembranaire de 20 acides aminés permettant leur ancrage dans la membrane plasmique et une région cytoplasmique comprenant le domaine à activité tyrosine kinase (Figure 1) (Hubbard, 1999). La région extracellulaire est très variable entre les RTKs. On peut y retrouver par exemple, des domaines riches en cystéine ou en leucine, des domaines *Immunoglobulin-like* (Ig) ou encore des domaines fibronectine de type III. Ce sont ces différents domaines qui vont conférer aux RTKs leur spécificité de liaison au ligand. La région cytoplasmique contient quant à elle un domaine kinase très conservé entre les RTKs. Après liaison avec leur ligand, les RTKs vont se dimériser, et s'autophosphoryler entraînant un changement conformationnel responsable de leur activation. C'est dans cette nouvelle forme active qu'ils vont pouvoir initier l'activation de différentes voies de signalisation comme la voie des MAPK (mitogene-activated protein kinase), PI3K (phosphoinositide-3 kinase) et SRC (*sarcome proto-oncogene*). L'activation de ces voies leur permet d'induire de nombreux processus cellulaires comme la survie, la prolifération, la mobilité ou encore la différenciation (Lemmon and Schlessinger, 2010). Un ligand peut activer un ou plusieurs RTKs. Par exemple l'*hepatocyte growth factor/Scatter factor* (HGF/SF) est spécifique du récepteur MET alors que le VEGF-A peut activer plusieurs membres de la famille VEGFR (Lemmon and Schlessinger, 2010). Les ligands des RTKs sont des molécules extracellulaires diverses regroupant les facteurs de croissance, les facteurs neurotrophiques, les cytokines ou encore les hormones.

A.2. Les différentes familles

Les 20 différentes familles de RTKs sont classées en fonction de leurs homologies de structure. Par exemple, on distingue la famille des récepteurs à l'*epidermal growth factor* (EGF), nommée la

famille des EGFR/ERBB, regroupant l'EGFR (ou ERBB1), ERBB2, ERBB3 et ERBB4. Le domaine kinase des membres de cette famille est très conservé, bien qu'une substitution de 3 acides aminés ait été décrite pour ERBB3 étant à la base d'une altération de son activité kinase (Guy et al., 1994). De plus, ces récepteurs possèdent six cystéines très conservées sur leur partie extracellulaire qui sont impliquées dans leur liaison avec les facteurs de croissance de la famille de l'EGF (Lemmon et al., 2014; Yarden and Sliwkowski, 2001). La génération de souris « knock-out » pour chacun des membres de la famille conduit à la mort des embryons *in utero*. Ces souris présentent des anomalies de développement pour de nombreux organes et démontrent l'importance de ces RTKs lors de l'embryogenèse et l'organogenèse (Gassmann et al., 1995; Lee et al., 1995; Sibilias and Wagner, 1995).



Il existe également d'autres grandes familles de RTKs comme celle des récepteurs au *vascular epidermal growth factor* (VEGFR) et la famille des récepteurs au *fibroblast growth factor* (FGFR) qui comptent 3 et 4 membres respectivement. Pour ces deux familles également, leur rôle lors du développement a été clairement établi (Olsson et al., 2006; Ornitz and Marie, 2015). Une liste exhaustive des 20 familles de RTKs est représentée dans la [figure 1](#). Au regard des voies activées par les différents RTKs, leur dérégulation va perturber un grand nombre de processus cellulaires et être impliquée dans le développement de nombreuses pathologies et plus particulièrement dans le cancer (Du and Lovly, 2018).

A.3. RTKs et cancer

La dérégulation de RTKs dans les cancers fait suite à diverses altérations moléculaires conduisant à leur sur-activation. Ces altérations incluent les mutations, les réarrangements chromosomiques, l'amplification génique ou encore l'activation autocrine (Lemmon and Schlessinger, 2010). Pour continuer sur l'exemple de l'EGFR, il fut le premier RTK découvert mais également le premier identifié comme ayant un rôle direct dans la tumorigenèse (Carpenter et al., 1975; Lemmon et al., 2014). Sa dérégulation a été décrite dans de nombreux types de cancer comme le cancer du poumon, le cancer du sein, le glioblastome, le cancer du côlon etc. Par exemple, il est retrouvé muté dans 10% des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) de patients d'origine caucasienne (Cortot and Jänne, 2014). Il est à noter que la mutation L858R, touchant le domaine kinase, représente 36% des mutations décrites de l'EGFR tous types de cancer confondus (COSMIC, Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) et 41% dans le cas du cancer du poumon. Cette mutation est impliquée dans la sur-activation de la kinase et confère aux cellules qui l'expriment des capacités transformantes (Lynch et al., 2004). D'autre part, l'amplification génique de l'EGFR, qui conduit à une surexpression accrue du récepteur entraînant sa sur-activation, a été décrite dans 10-30% des CBNPC et environ 40% des glioblastomes (Cortot and Jänne, 2014; Wikstrand et al., 1998).

Ces dernières années, la découverte d'altérations moléculaires de RTKs dans les cancers a augmenté de façon exponentielle, grâce notamment au séquençage à haut débit. Certaines de ces modifications sont aujourd'hui connues pour suractiver les RTKs ou pour les activer de façon indépendante du ligand. En conséquence, l'inhibition de leur signalisation constitue une cible de choix pour lutter contre les cancers. Toutefois, il est important de noter que pour une grande majorité de mutations leurs conséquences fonctionnelles sont encore totalement inconnues. En effet, une mutation, même localisée dans le domaine kinase d'un RTK, ne va pas obligatoirement conduire à la suractivation du récepteur. C'est le cas, par exemple, de la mutation E655K de DDR2 qui n'augmente

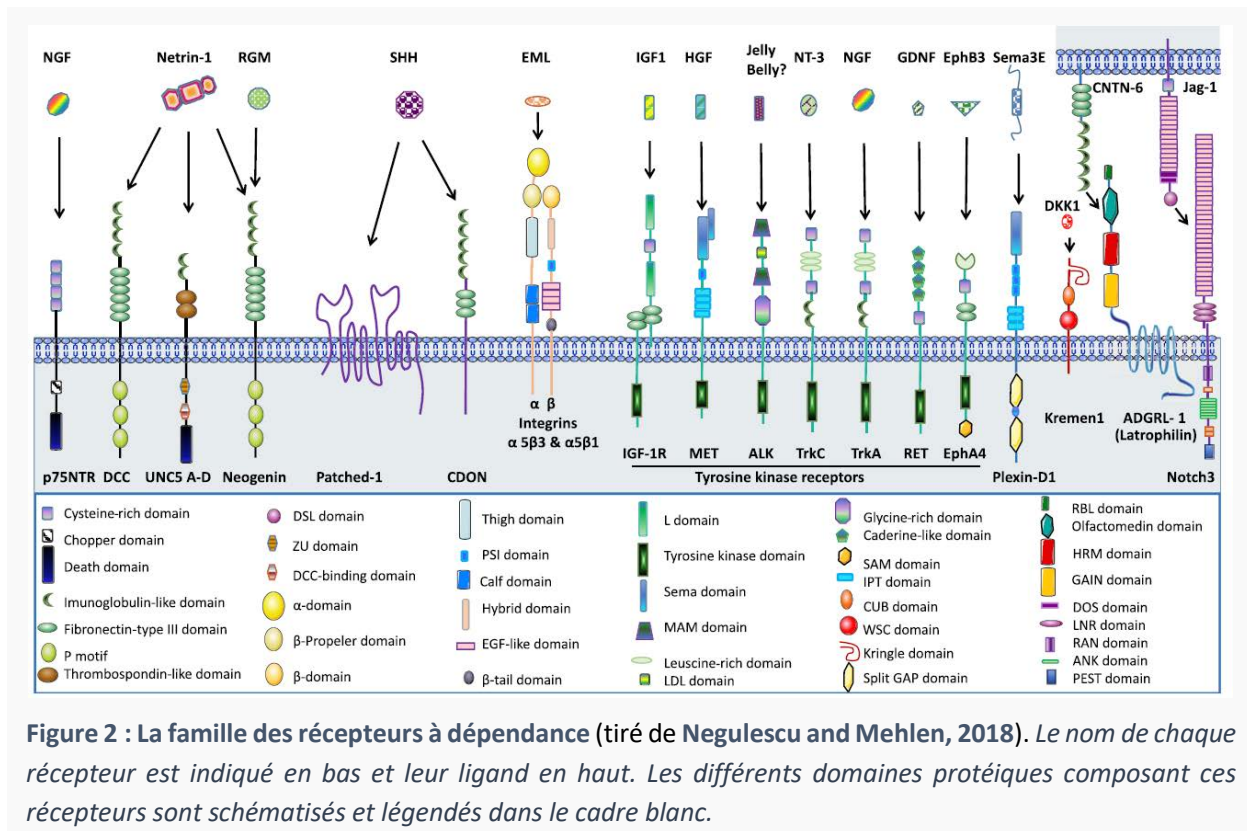
pas la phosphorylation du récepteur ni ses capacités transformantes *in vitro* (Terashima et al., 2016). Cette notion est très importante car cibler la signalisation des RTKs qui portent ce type de mutation n'aura aucun avantage thérapeutique.

Alors que la famille des RTKs regroupe des récepteurs qui possèdent une homologie de séquence, il existe également des familles de récepteurs membranaires regroupés en rapport à leur fonction. C'est le cas, par exemple, de la famille des récepteurs à dépendance.

B – Les récepteurs à dépendance, des récepteurs à deux visages

B.1. Caractéristiques des récepteurs à dépendance

Par définition, les récepteurs à dépendance sont des récepteurs qui vont, en présence de leur ligand, activer les voies de survie cellulaire tandis qu'en leur absence, ils ne vont pas rester inactifs mais vont être capables de favoriser la mort des cellules par apoptose. Ainsi, la survie des cellules exprimant ces récepteurs peut être dépendante de la présence du ligand. Une grande partie de ces récepteurs sont impliqués dans le développement du système nerveux. D'une part, leur capacité pro-survie favorise la prolifération des cellules et la formation d'un réseau. A l'opposé, leur capacité à induire l'apoptose en absence de ligand permet de contrôler le nombre de cellules dans certaines régions du cerveau et prévenir la migration neuronale et la projection d'axones dans des zones où le ligand n'est pas disponible (Mehlen and Bredesen, 2004).



De plus en plus de récepteurs semblent appartenir à cette famille des récepteurs à dépendance, une famille basée non pas sur la structure des récepteurs mais sur leur fonctionnalité. Parmi les plus connus, on retrouve le récepteur aux neurotrophines p75^{NTR} (*p75 neurotrophin receptor*)(Rabizadeh et al., 1993), DCC (*deleted in colorectal cancer*)(Mehlen et al., 1998), les récepteurs UNC5H (*uncoordinated gene 5H*)(Llambi et al., 2001), mais également certains RTKs comme MET (Tulasne et al., 2004), TrkC (Tauszig-Delamasure et al., 2007) ou encore RET (*rearranged during transfection*)(Bordeaux et al., 2000) (Figure 2).

Tous ces récepteurs vont révéler leurs capacités pro-apoptotiques à la suite de leur clivage par des protéases, le plus souvent par les caspases. En présence de leur ligand, le clivage par les caspases est bloqué. Ceci pourrait s'expliquer par l'inaccessibilité du site suite à un changement de conformation ou par la dimérisation du récepteur induite par le ligand (Mille et al., 2009; Wang et al., 2000, 2009). En absence de ligand, les sites de clivage sont accessibles aux caspases. Le clivage des récepteurs à dépendance va conduire (i) soit au démasquage d'un domaine pro-apoptotique, (ii) soit à la libération d'un fragment pro-apoptotique (Figure 3). Cette étape est nécessaire pour activer les fonctions apoptotiques des récepteurs à dépendance car la mutation de ces sites de clivage empêche l'induction de la mort cellulaire (Foveau et al., 2007; Mehlen et al., 1998).

Dans le cas du récepteur DCC, le clivage va conduire au démasquage d'un domaine pro-apoptotique appelé domaine de dépendance. Celui-ci est porté par la partie du récepteur qui reste ancrée à la membrane et va recruter puis activer la caspase 9 permettant ainsi l'activation de la caspase 3 (Forcet et al., 2001). Les mécanismes responsables du recrutement de la caspase 9 au niveau du domaine de dépendance ne sont pas encore complètement élucidés mais semblent se faire de manière indirecte par l'intermédiaire de protéines adaptatrices (Liu et al., 2002) (Figure 3). Pour MET ou TrkC, le clivage par les caspases conduit à la libération d'un fragment dans le cytosol qui va porter les fonctions pro-apoptotiques. Dans leur cas, la relocalisation du fragment aux abords des mitochondries et son interaction avec des partenaires pro-apoptotiques vont activer la voie intrinsèque de l'apoptose menant à l'activation des caspases (Lefebvre et al., 2013; Tauszig-Delamasure et al., 2007) (Figure 3). Ainsi, l'action pro-apoptotique des récepteurs à dépendance va passer par l'activation des caspases pour induire l'apoptose. En effet, des expériences ont montré que ces récepteurs sont incapables d'induire l'apoptose en présence d'inhibiteurs de caspases comme le z-VAD-fmk (Bordeaux et al., 2000; Forcet et al., 2001; Mehlen et al., 1998).

En conclusion, les récepteurs à dépendance sont à la fois des substrats et des activateurs de caspases. Ce paradoxe pourrait s'expliquer par le fait que les premiers clivages pourraient se réaliser par des protéases autres que les caspases. Puis, une fois activées, les caspases prendraient le relais.

L'autre hypothèse serait que, même dans les cellules non apoptotiques, il y ait un pool de caspases activées et que cette activité résiduelle soit suffisante pour cliver les récepteurs dissociés de leur ligand (Goldschneider and Mehlen, 2010). La dernière hypothèse serait qu'il faudrait une activation des caspases par un autre mécanisme, pour que le processus de clivage des récepteurs à dépendance se mette en place.

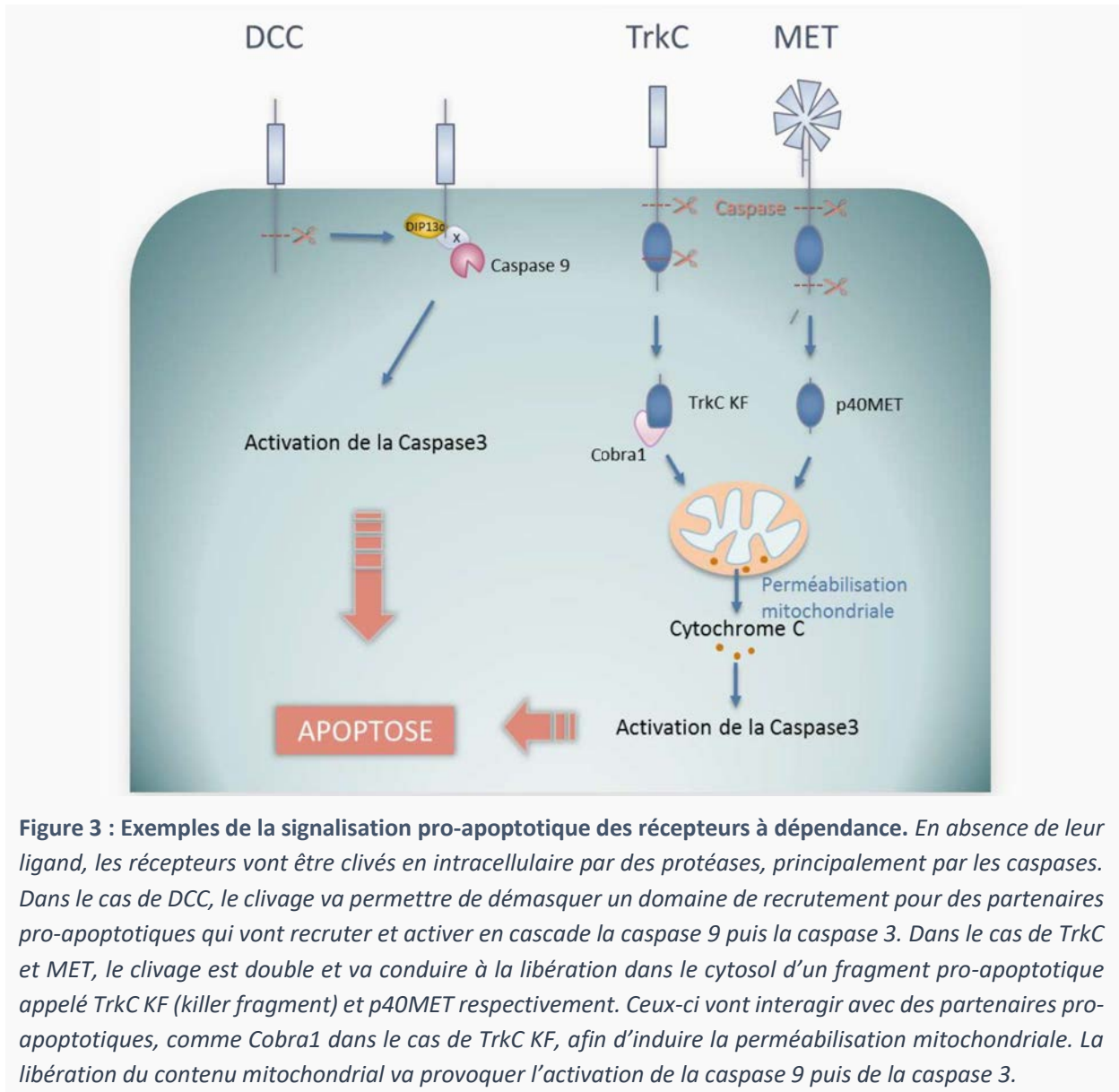


Figure 3 : Exemples de la signalisation pro-apoptotique des récepteurs à dépendance. En absence de leur ligand, les récepteurs vont être clivés en intracellulaire par des protéases, principalement par les caspases. Dans le cas de DCC, le clivage va permettre de démasquer un domaine de recrutement pour des partenaires pro-apoptotiques qui vont recruter et activer en cascade la caspase 9 puis la caspase 3. Dans le cas de TrkC et MET, le clivage est double et va conduire à la libération dans le cytosol d'un fragment pro-apoptotique appelé TrkC KF (killer fragment) et p40MET respectivement. Ceux-ci vont interagir avec des partenaires pro-apoptotiques, comme Cobra1 dans le cas de TrkC KF, afin d'induire la perméabilisation mitochondriale. La libération du contenu mitochondrial va provoquer l'activation de la caspase 9 puis de la caspase 3.

B.2. Récepteurs à dépendance et cancer

Grâce à leur capacité à induire l'apoptose en absence de ligands, il a été proposé que ces récepteurs puissent être de potentiels suppresseurs de tumeurs. L'hypothèse est, qu'au cœur de la tumeur le ligand des récepteurs à dépendance n'est pas ou peu accessible. Dans ce cas de figure, les

cellules tumorales exprimant ces récepteurs devraient entrer en apoptose, ce qui limiterait la croissance tumorale. A l'inverse, la perte de ces potentiels suppresseurs de tumeurs, à la suite de diverses altérations moléculaires, serait favorable au développement tumoral.

Dès sa découverte, le récepteur DCC a été proposé comme un potentiel suppresseur de tumeurs puisque son gène est retrouvé délété dans plus de 70% des cancers colorectaux (Fearon et al., 1990). Cependant, ce postulat a été rapidement mis à mal car peu de mutations inactivatrices de DCC ont été identifiées. En effet, bien que diverses altérations moléculaires peuvent être responsables de l'inhibition d'un gène suppresseur de tumeur, à l'époque, les mutations inactivatrices étaient considérées comme indispensables pour valider l'appartenance d'une protéine à ce groupe (Voir la revue : Mehlen and Fearon, 2004). De plus, une étude a temporairement clôturé le débat en montrant que l'inactivation de DCC chez la souris n'était pas associée à une augmentation de la tumorigénèse (Fazeli et al., 1997). C'est sa caractérisation en tant que récepteur à dépendance qui a permis de déterminer que DCC est un suppresseur de tumeur conditionnel, c'est-à-dire uniquement en absence de ligand (Goldschneider and Mehlen, 2010). Voici un exemple pour illustrer ce propos : dans l'épithélium intestinal où les cellules migrent constamment depuis la base des villosités vers leur sommet, le ligand de DCC, la netrin-1, est fortement exprimée dans les cryptes puis son niveau décroît en remontant le long des villosités. DCC joue un rôle crucial dans l'homéostasie de l'épithélium car arrivées au sommet des villosités, les cellules dépourvues de ligand, vont entrer en apoptose et permettre de maintenir un nombre de cellules constant au niveau de l'épithélium (Mehlen and Tauszig-Delamasure, 2014). Partant de ce modèle, une étude a démontré que la surexpression de la netrin-1, au niveau de l'épithélium intestinal murin conduit à la diminution importante de l'apoptose provoquant la formation de lésions hyperplasiques et néoplasiques spontanées (Mazelin et al., 2004). En réponse à l'article de Fazeli et al. (1997) une autre étude a déterminé que même si les souris n'exprimant pas DCC ne développent pas de tumeurs spontanées, leur croisement avec des souris porteuses de la mutation APC (*adenomatous polyposis coli*), qui présentent une prédisposition au cancer colorectal, a permis de montrer une augmentation du nombre de tumeurs (Castets et al., 2012). Ces résultats ont également été retrouvés suite au croisement de souris surexprimant la Netrin-1 avec des souris APC démontrant ainsi que DCC fonctionne bel est bien comme un suppresseur de tumeurs (Mazelin et al., 2004).

La Netrin-1 peut également activer d'autres récepteurs à dépendance qui appartiennent à la famille des récepteurs UNC5H. Comme le récepteur DCC, ils sont sous-exprimés dans un grand nombre de cancers (Bernet et al., 2007; Thiebault et al., 2003). Cette baisse d'expression s'explique essentiellement par la méthylation de leurs promoteurs. Le croisement de souris inactivées pour UNC5H3 avec des souris APC présentent une augmentation de l'agressivité tumorale depuis des

adénomes de bas grade vers des tumeurs de haut grade témoignant, là encore, qu'un récepteur à dépendance peut être considéré comme un suppresseur de tumeur (Bernet et al., 2007).

Le cas des récepteurs à dépendance appartenant à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase est un peu plus complexe. En effet, les RTKs sont essentiellement considérés comme des proto-oncogènes en raison de leur capacité à favoriser la survie cellulaire à la suite de leur activation. Paradoxalement, en absence de ligand certains de ces RTKs sont capables d'induire l'apoptose et ainsi d'être désignés comme suppresseurs de tumeur. Par exemple, le récepteur TrkC a longtemps été décrit comme un oncogène principalement car des réarrangements chromosomiques avec le gène de la tropomyosine ou ETV6 (*ETS translocation variant 6*) ont été observés dans plusieurs cancers (Nakagawara, 2001). En 2013, une équipe apporte une preuve concernant un potentiel rôle de TrkC en tant que suppresseur de tumeur car son gène est fréquemment retrouvé méthylé dans des échantillons de tumeurs colorectales. Cette méthylation est associée à une baisse d'expression de TrkC (Luo et al., 2013a). De la même manière, alors que RET était seulement considéré comme un oncogène, des modifications épigénétiques conduisant à sa sous-expression ont été identifiées dans des cas de cancers colorectaux (Luo et al., 2013b). Ainsi, les RTKs appartenant au groupe des récepteurs à dépendance peuvent à la fois agir comme des oncogènes et comme suppresseurs de tumeurs contrôlant l'apoptose (Mehlen and Tauszig-Delamasure, 2014). Le cas de MET sera abordé dans la discussion.

B.3. Potentiel thérapeutique

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de la perte des capacités apoptotiques des récepteurs à dépendance : (i) une baisse d'expression du récepteur causée par la méthylation du promoteur en amont du gène, (ii) des mutations des sites de clivages, (iii) l'inactivation d'un partenaire du récepteur nécessaire à l'induction de l'apoptose et (iv) la surexpression du ligand ou une production autocrine empêchant l'activation du processus pro-apoptotique (Mehlen and Tauszig-Delamasure, 2014). C'est cette dernière qui semble avoir le plus grand potentiel thérapeutique. En effet, l'utilisation de molécules bloquant l'interaction ligand-récepteur pourrait favoriser l'induction de l'apoptose. Ainsi, plusieurs études précliniques évaluant leurs effets sur la progression tumorale ont vu le jour. Par exemple, l'utilisation de molécules qui bloquent l'interaction de la Netrin-1 avec ses récepteurs (siARN ou molécules compétitrices semblables au récepteur DCC), montre une augmentation de l'apoptose *in vitro* et une inhibition du développement tumoral *in vivo* (Delloye-Bourgeois et al., 2009; Dumartin et al., 2010; Fitamant et al., 2008). De plus, une étude a montré qu'un traitement par chimiothérapie de plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines induit une augmentation significative de la

Netrin-1 et de ses récepteurs. De façon très intéressante, la combinaison d'un agent anticancéreux, la doxorubicine, avec une molécule bloquant l'action de la Netrin-1 potentialise l'inhibition de la croissance tumorale dans un modèle murin (Paradisi et al., 2013). Ces résultats montrent que l'association de la chimiothérapie avec des inhibiteurs de l'interaction ligand-récepteur, dans le cas des récepteurs à dépendance, pourrait être une approche thérapeutique prometteuse. Ces différentes recherches ont abouti au développement d'un anticorps monoclonal contre la Netrin-1 (NP137) qui est aujourd'hui en étude clinique de phase I (NCT02977195) chez des patients atteints de tumeurs solides métastatiques. Enfin, d'autres études évaluent le potentiel d'inhibition de l'interaction d'autres récepteurs à dépendance avec leur ligand, comme UNC5H ou TrkA et C (Negulescu and Mehlen, 2018).

En conclusion, de plus en plus d'arguments montrent que la progression tumorale peut être régulée par les récepteurs à dépendance mais aussi que l'inhibition de l'interaction ligand-récepteur a un potentiel thérapeutique prometteur.

II – Le récepteur MET

A – La signalisation du récepteur MET

A.1. Les premières découvertes

A.1.1. Le récepteur MET

C'est en 1984 que le récepteur MET a été décrit pour la première fois sous la forme d'un oncogène issu d'un réarrangement chromosomique à l'origine de la fusion TPR-MET (Cooper et al., 1984). Des expériences menées sur des cellules HOS (*Human osteosarcoma*) traitées par un carcinogène chimique ont mis en évidence l'apparition d'un phénotype transformant. L'oncogène responsable de cette transformation résulte d'un réarrangement chromosomique entre le chromosome 1 q25, au niveau du gène codant pour la protéine TPR (*translocated promoter region*), et le chromosome 7 q21-q31 codant pour un domaine encore inconnu jusque-là. Toutefois, ce domaine est très similaire au domaine cytoplasmique des RTKs car il contient un domaine à activité tyrosine kinase (Park et al., 1986). Ce nouveau RTK est appelé MET en rapport au nom de l'agent carcinogène qui a permis sa découverte le N-**Methyl**-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. La fusion TPR-MET est composée du domaine de dimérisation de TPR accolé au domaine à activité tyrosine kinase de MET. Dans ces circonstances, le domaine TPR mène à la formation de dimères ce qui provoque l'activation constitutive du domaine kinase de MET, même en l'absence de son ligand, et confère aux cellules qui expriment cette fusion des capacités transformantes (Peschard and Park, 2007).

Le gène humain codant pour le récepteur MET se trouve donc sur la bande 7 q21-q31 du chromosome 7. Il comprends 21 exons entrecoupés par 20 introns sur une longueur totale de 120kb (Lin et al., 1998). Le récepteur MET est exprimé dans de nombreux types cellulaires comme les cellules épithéliales, endothéliales ou encore neuronales. A la suite de sa traduction, MET est d'abord présent sous la forme d'un précurseur de 150 kDa. Lors de son transport vers la membrane, le récepteur MET va subir différentes modifications post-traductionnelles permettant l'expression d'une protéine fonctionnelle. Dans un premier temps, MET va être N-glycosylé au niveau du futur domaine extracellulaire (Giordano et al., 1989; Mark et al., 1992). Puis le récepteur, qui pèse désormais 170 kDa, va être clivé par la furine au niveau du site K₃₀₃-R-K-K-R-S₃₀₈ responsable de la formation d'un hétérodimère composé de deux chaînes α et β de 50 kDa et de 145 kDa reliées par des ponts disulfures (Tempest et al., 1988). La chaîne α , codée entièrement par l'exon 2, est strictement extracellulaire

alors que la chaîne β , codée par les exons 2 à 21, est extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique (Lin et al., 1998) (Figure 4).

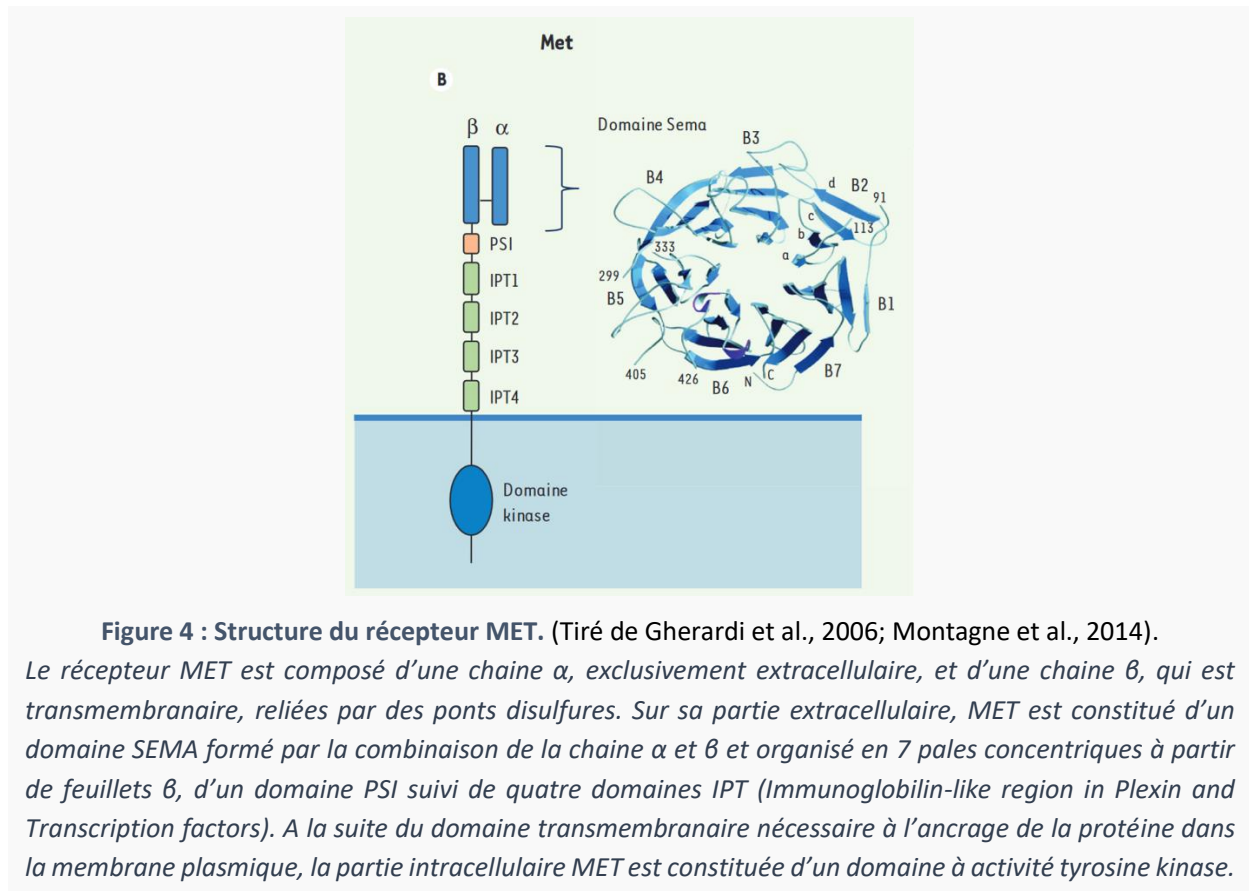


Figure 4 : Structure du récepteur MET. (Tiré de Gherardi et al., 2006; Montagne et al., 2014).

Le récepteur MET est composé d'une chaîne α , exclusivement extracellulaire, et d'une chaîne β , qui est transmembranaire, reliées par des ponts disulfures. Sur sa partie extracellulaire, MET est constitué d'un domaine SEMA formé par la combinaison de la chaîne α et β et organisé en 7 pales concentriques à partir de feuillets β , d'un domaine PSI suivi de quatre domaines IPT (Immunoglobulin-like region in Plexin and Transcription factors). A la suite du domaine transmembranaire nécessaire à l'ancrage de la protéine dans la membrane plasmique, la partie intracellulaire MET est constituée d'un domaine à activité tyrosine kinase.

La partie extracellulaire de MET est composée de 6 domaines distincts (Figure 4). A l'extrémité N-terminale de la protéine, on retrouve un domaine présentant une certaine homologie avec les domaines des sémaphorines et des plexines (dont le rôle est de guider la croissance des axones) qui est appelé le domaine SEMA. Celui-ci a la caractéristique d'être formé à la fois par la chaîne α et β du récepteur. L'analyse par cristallographie montre que ce domaine présente une structure très caractéristique en sept pales concentriques constituées de feuillets β (Stamos et al., 2004). Un second domaine, nommé PSI car il possède des homologies de séquence avec les domaines des plexines, des sémaphorines et des intégrines, suit le domaine SEMA. S'ensuivent 4 domaines homologues aux immunoglobulines qui sont les domaines IPT (*Immunoglobulin-like region in Plexin and Transcription factors*) (Gherardi et al., 2003; Stamos et al., 2004).

Puis, il y a l'hélice transmembranaire qui permet de relier le domaine extracellulaire de MET au domaine intracellulaire et qui est essentiel à la signalisation du récepteur. Le domaine intracellulaire est, quant à lui, constitué d'une partie juxtamembranaire possédant de nombreux sites de régulation négative, un domaine kinase responsable de l'activité du récepteur, et une partie C-terminale

contenant les sites de recrutement des protéines de la signalisation (Montagne et al., 2014; Schiering et al., 2003).

A.1.2. Le ligand : HGF/SF

L'*hepatocyte growth factor/Scatter factor* (HGF/SF) a été découvert par deux équipes différentes à peu de temps d'intervalle ce qui explique sa double nomination. Dans un premier temps, l'équipe de Nakamura et al. a isolé un facteur mitogène des hépatocytes à partir de sérum de rats partiellement hépatectomisés. Cette caractéristique lui confère le nom d'*hepatocyte growth factor* (HGF) (Nakamura et al., 1984). Trois ans plus tard, l'équipe de Stoker et al. identifie un facteur issu de fibroblastes embryonnaires capable d'augmenter la mobilité et la dispersion des cellules épithéliales, le *scatter factor* (SF) (Stoker et al., 1987). C'est en 1991, que les deux facteurs sont décrits comme étant un seul et même facteur agissant par l'intermédiaire d'un seul récepteur, le récepteur MET (Bottaro et al., 1991; Gherardi and Stoker, 1990; Naldini et al., 1991).

Le gène de l'*HGF/SF* est situé au niveau du chromosome 7 sur la bande q21.1 et se compose de 18 exons et de 17 introns (Seki et al., 1991). L'HGF/SF est une glycoprotéine hétérodimérique de 90 kDa classée dans la famille des facteurs de croissance. Principalement sécrétée par les cellules mésenchymateuses, l'HGF/SF est retrouvé dans la matrice extracellulaire de nombreux tissus où il est retenu grâce à sa forte affinité avec les protéoglycanes (tel que les héparanes sulfates) et sous la forme d'un précurseur inactif, le pro-HGF/SF (Lyon et al., 1994). Ce n'est seulement qu'après son clivage en deux chaînes polypeptidiques α et β liées par un pont disulfure que l'HGF/SF devient un hétérodimère actif (Gherardi et al., 2012). Ce clivage peut s'effectuer par différentes protéases comme l'activateur de l'HGF appelé HGFA, la matriptase ou encore l'hepsine (Owen et al., 2010).

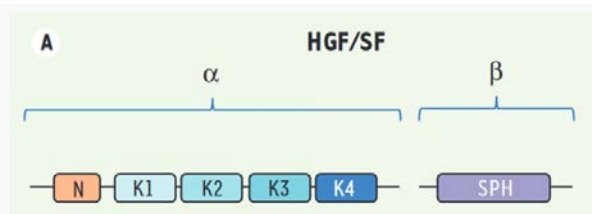


Figure 5 : Structure de l'HGF/SF (tiré de Montagne et al., 2014).

L'HGF/SF est composé de 6 domaines, le domaine N-terminal (N) suivi de 4 domaines kringle (K1-K4) formant la sous-unité α et d'un domaine homologue aux sérines protéases (SPH) formant la sous-unité β .

L'HGF/SF actif est composé de deux sous unités α de 69 kDa et β de 34 kDa (Figure 5). La sous unité α est formée d'un domaine N-terminal, contenant un site de liaison de haute affinité à l'héparine, accompagné de quatre domaines « kringle ». La sous unité β est constituée d'un unique domaine homologue aux sérines protéases, le domaine SPH (*serine protease homology*) mais qui est dépourvu

d'activité enzymatique par la présence de mutation sur la séquence (Birchmeier et al., 2003; Gherardi et al., 2012). La diffusion de l'HGF/SF est limitée *in vivo* car il a une forte affinité avec les protéoglycanes qui vont partiellement le piéger (Hartmann et al., 1998). Dans certains cas, il semblerait que la capacité de l'HGF/SF à se lier aux protéoglycanes faciliterait la dimérisation et l'activation de MET sans toutefois être nécessaire (Kemp et al., 2006).

A.1.3. Interactions entre l'HGF et MET

L'interaction entre MET et son ligand l'HGF/SF implique d'une part les pales 2 et 3 de l'hélice β , correspondant au domaine SEMA de MET, et d'autre part les domaines N-K1 et SPH de l'HGF/SF (Figure 6) (Stamos et al., 2004). Il faut ajouter à cela que, lorsqu'il est lié à MET, l'HGF/SF va se dimériser au niveau de ses domaines N et K1 via une interaction tête-bêche permettant ainsi la dimérisation du récepteur et son activation (Figure 6) (Gherardi et al., 2006). D'autre part, un autre article a décrit un potentiel deuxième site de liaison au niveau des domaines N et K1 de l'HGF/SF et des domaines IPT3 et IPT4 de MET (Basilico et al., 2008). Concernant le précurseur inactif pro-HGF, il peut également se lier au récepteur malgré son incapacité à l'activer, et entre ainsi en compétition avec l'HGF actif (Lokker et al., 1992; Mazzone et al., 2004). Cette caractéristique suggère que l'activation de MET ne dépend pas seulement de la quantité d'HGF dans le milieu extracellulaire mais également du rapport HGF/pro-HGF.

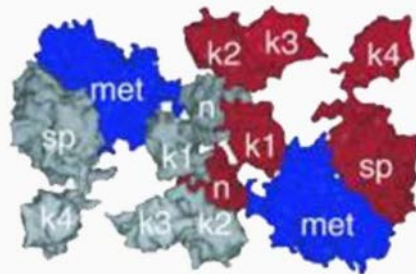


Figure 6 : Structure cristallographique des liaisons entre l'HGF/SF et MET (tiré de Gherardi et al., 2006). Deux molécules d'HGF/SF en rouge et gris respectivement se dimérisent via leurs domaines N-K1 associés tête-bêche et SPH conduisant à la dimérisation du récepteur MET représenté en bleu. N : domaine N-terminal, k1 à k4 : domaine kringle 1 à 4, sp : domaine homologue aux sérines protéases (SPH dans le texte).

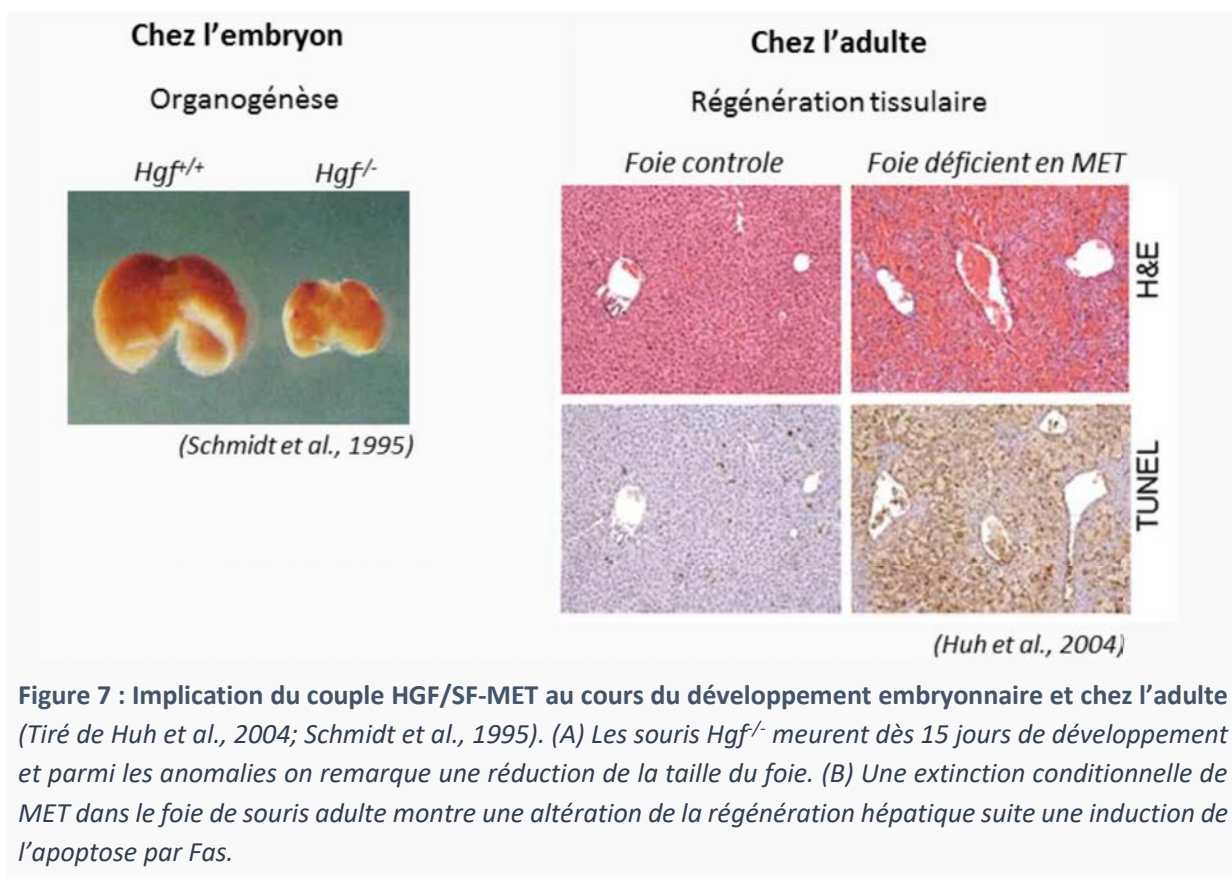
A.2. Les rôles du couple HGF-MET

A.2.1. Fonctions d'HGF-MET lors du développement embryonnaire

Une comparaison de l'expression de MET et de son ligand au cours de l'embryogenèse a montré que leur schéma d'expression varie en fonction du stade de développement. Lors de la gastrulation, leur expression est superposée et retrouvée à la fois dans l'endoderme et dans une partie du mésoderme suggérant un mode d'action autocrine de l'HGF. A l'inverse, lors des phases précoces

de l'organogénèse, leur co-expression n'est retrouvée que dans de rares zones que sont le tube neural, les somites et le cœur. Dans le reste de l'embryon, leur expression devient totalement distincte avec l'expression de MET dans les tissus épithéliaux et l'HGF/SF au niveau des tissus mésenchymateux. Ce nouveau profil d'expression est en faveur d'une activation paracrine du récepteur (Andermarcher et al., 1996).

Au cours des années 90, des expériences invalidant les gènes de *Met* ou de *Hgf/Sf* chez la souris ont permis de déterminer que le couple jouait un rôle crucial lors des processus de développement embryonnaire dont l'organogénèse. En effet, l'inactivation de ces gènes est létale *in utero* à 15 jours de développement et les embryons *Met*^{-/-} et *Hgf/Sf*^{-/-} présentent des altérations phénotypiques similaires. Parmi celles-ci on retrouve un défaut de développement du trophoblaste, qui est à l'origine de la létalité, une réduction de la taille du foie (Figure 7A) ainsi qu'une absence de muscles squelettiques au niveau des bourgeons de membre, du diaphragme et au sommet de la langue (Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995). Alors que le défaut de développement du foie s'explique par une baisse de la survie et de la prolifération des hépatocytes, l'altération de la répartition des cellules musculaires est due à une baisse de migration des précurseurs myoblastiques (Bladt et al., 1995; Schmidt et al., 1995). Ces résultats montrent l'importance et la diversité des réponses induites par le couple HGF/SF-MET dès l'embryogenèse.



Dans les années 2000, l'extinction de MET par des expériences de knock-out (KO) conditionnel ont permis de mieux comprendre l'implication de MET dans le développement de différents organes. Par exemple, l'inactivation de MET dans les poumons inhibe de façon importante le développement alvéolaire (Calvi et al., 2013). Dans le cas du rein, l'absence conditionnelle de MET est corrélée avec une réduction du nombre de néphron ainsi qu'une diminution globale de la taille de l'organe (Ishibe et al., 2009). On peut également souligner qu'une surexpression de l'EGFR a été détectée dans les souris *Met*^{-/-} suggérant que MET et l'EGFR peuvent agir en coopération pour assurer le bon développement des organes. Enfin, l'extinction de MET dans le système nerveux central peut conduire à une perte d'un sous-groupe de motoneurones (Lamballe et al., 2011). Ces différents exemples démontrent que la signalisation du récepteur MET est cruciale car elle participe activement à l'organogenèse.

A.2.2. Fonctions d'HGF-MET sur la balance survie/apoptose chez l'adulte

L'expression du récepteur MET est détectée dans un très grand nombre d'organes chez l'adulte tels que le foie, les reins ou encore les poumons. Des expériences de KO conditionnel de MET dans des foies de souris adulte n'affecte pas les fonctions des hépatocytes en condition physiologique. En revanche, suite à un traitement hépatotoxique ou suite à une hépatectomie partielle ces souris montrent une sensibilisation à l'apoptose (Figure 7B) et un retard de la régénération du tissu (Borowiak et al., 2004; Huh et al., 2004). De manière cohérente, une augmentation de la quantité d'HGF dans le plasma a été détectée après lésion du foie mais également des poumons, de la rate, des reins ou encore de la peau (Chmielowiec et al., 2007; Kawaida et al., 1994; Mao et al., 2014; Sakamaki et al., 2002). Ainsi chez l'adulte, le couple HGF/SF-MET serait associé au processus de régénération tissulaire mais également dans le maintien de l'homéostasie épithéliale. Certaines études montrent que l'HGF a un rôle mitogène sur les cellules *in vivo* mais également sur leur survie (Liu et al., 1994). Par exemple, un traitement à l'HGF va protéger les hépatocytes en diminuant l'apoptose induite par le récepteur de mort Fas (Kosai et al., 1998) ou les cardiomyocytes après des expériences d'ischémie/reperfusion (Nakamura et al., 2000).

Dans le cas du foie, MET est particulièrement important dans la régulation de la balance survie/apoptose (Furlan and Tulasne, 2014). D'une part, nous avons vu qu'en présence d'HGF, MET favorise la survie et la prolifération des cellules. D'autre part, il a été montré que dans les hépatocytes, MET pouvait se lier directement aux récepteurs de mort Fas qui sont fortement exprimés dans le foie. Cette interaction empêche l'activation de Fas par agrégation et prévient l'induction de l'apoptose. La séquestration de Fas par le récepteur MET est une autre explication à son rôle pro-survie dans le foie (Wang et al., 2002).

A.2.3. Fonctions d'HGF/MET *in vitro* sur des lignées cellulaires

En culture sur des lignées épithéliales, la signalisation de MET se traduit par de nombreuses possibilités de réponses biologiques expliquées par la grande diversité des voies de signalisation activées (Maulik et al., 2002). Ces réponses vont varier en fonction du contexte cellulaire et des conditions de culture. Tout d'abord, comme je l'ai évoqué dans le paragraphe précédent, le couple favorise la survie en protégeant les cellules contre l'apoptose. En effet, de nombreuses études *in vitro* ont montré que la présence d'HGF/SF favorise la survie des cellules exposées à différents stress comme l'anoïkis, la privation en sérum ou encore l'activation des récepteurs de mort (Kosai et al., 1998; Liu et al., 1998; Longati et al., 1996; Reveneau et al., 2003; Yo et al., 1998).

D'autre part, les premiers articles traitant du rôle de l'HGF/SF, montre une augmentation de la prolifération des lignées épithéliales, qui semble liée à la capacité de MET à induire la régénération tissulaire chez l'adulte, ainsi qu'une capacité à se disperser lorsque les cellules sont cultivées à faible densité (Nakamura et al., 1986; Stoker et al., 1987). Ces deux caractéristiques sont à l'origine de l'appellation du ligand. De manière cohérente, le couple est également capable d'induire la mobilité, la migration et l'invasion des cellules à travers une matrice (Jeffers et al., 1998; Kermorgant et al., 2001). En culture dans une matrice tridimensionnelle mimant la matrice extracellulaire, les cellules épithéliales vont s'organiser en structure kystique. L'activation de la signalisation de MET par un traitement à l'HGF va permettre à ces kystes de former des réseaux dont le phénotype va dépendre du tissu d'origine, c'est la morphogenèse de branchement (Brinkmann et al., 1995; Montesano et al., 1991). Par exemple, des cellules issues du côlon vont avoir tendance à former des structures en cryptes alors que des cellules mammaires vont former des bourgeons semblables à des canaux mammaires en développement.

En conclusion, la signalisation du récepteur MET est cruciale lors du développement embryonnaire mais également dans le maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. La multitude de réponses observées en culture et *in vivo* peut s'expliquer par la diversité des protéines de signalisation recrutées suite à l'activation du récepteur.

A.3. Les cascades de signalisation

A.3.1. L'activation du récepteur :

L'activation de MET par son ligand provoque sa dimérisation puis sa trans-autophosphorylation au niveau de résidus tyrosines. Dans cette nouvelle conformation MET va pouvoir initier différentes cascades de signalisation qui vont être à l'origine des multiples réponses biologiques

observées *in vitro* comme la survie, la morphogénèse, la prolifération ou encore la migration (Figure 8). En premier lieu, la phosphorylation de MET a lieu sur les tyrosines 1234 et 1235 situées sur le domaine kinase du récepteur (Longati et al., 1994; Naldini et al., 1991). Une mutation de ces tyrosines a révélé leur importance pour l'activation du récepteur (Longati et al., 1994). En effet, ces tyrosines vont participer à la stabilisation du récepteur dans sa forme active et ainsi favoriser la phosphorylation d'autres tyrosines. Ainsi, le récepteur s'autophosphoryle sur deux tyrosines supplémentaires, les tyrosines 1349 et 1356, localisées sur la partie C-terminale du récepteur. Ces dernières sont indispensables pour la transduction du signal à la fois *in vitro* et *in vivo* (Maina et al., 1996; Ponzetto et al., 1994). Il a été montré que ces tyrosines sont responsables du recrutement de plusieurs protéines de la signalisation qui vont être à la base de la transduction du signal (Tulasne et al., 1999). Elles vont interagir avec des protéines contenant un domaine *Src homology-2* (SH2), un domaine *phosphotyrosine binding* (PTB) ou encore un *MET binding domain* (MBD) (Pelicci et al., 1995; Schaeper et al., 2000). MET est également phosphorylé sur la tyrosine 1003 située dans la région juxtamembranaire. Cette dernière est impliquée dans la dégradation du récepteur car elle fait partie du site de reconnaissance par CBL, une E3 ubiquitine ligase. En effet, la protéine CBL, connue pour être responsable de la dégradation de nombreux RTKs, va reconnaître le motif DY₁₀₀₃R de MET et provoquer son ubiquitination (Lupher et al., 1998; Peschard et al., 2004) (Figure 8).

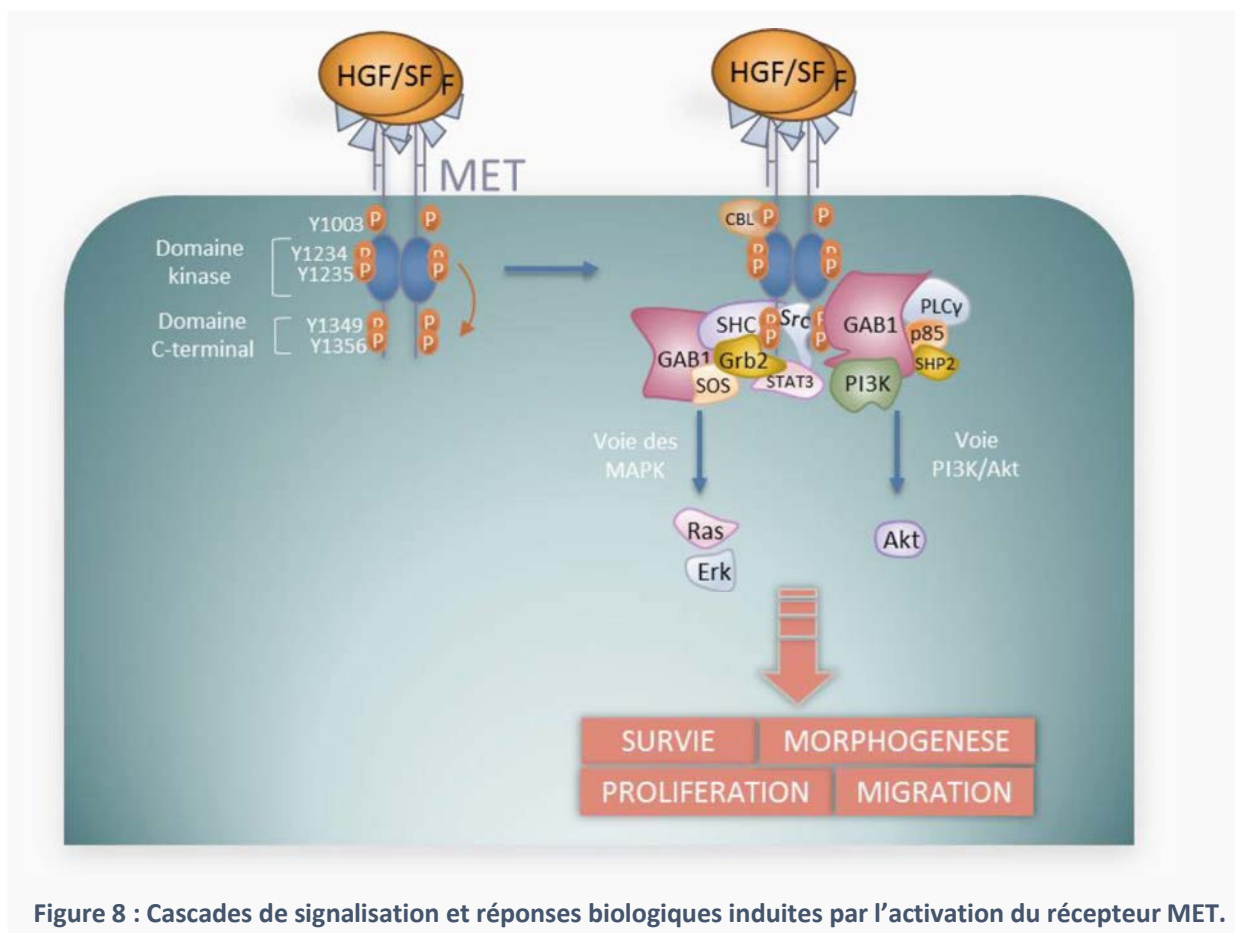


Figure 8 : Cascades de signalisation et réponses biologiques induites par l'activation du récepteur MET.

Suite à sa liaison avec l'HGF/SF, MET va se dimériser et s'auto-phosphoryler sur des résidus tyrosines. Les tyrosines 1349 et 1356, situées en C-terminal, vont permettre le recrutement de plusieurs protéines adaptatrices comme GAB1 et GRB2 conduisant au recrutement d'autres effecteurs et à l'activation de nombreuses voies de signalisation comme la voie RAS/MAPK ou PI3K/AKT. L'activation de ces voies entraîne divers effets biologiques comme la survie, la morphogénèse, la prolifération ou encore la migration.

A.3.2 Les protéines partenaires :

La propagation du signal est assurée par le recrutement de plusieurs protéines partenaires au niveau des tyrosines phosphorylées en C-terminale. Parmi ces protéines de la signalisation on retrouve les protéines GRB2, GAB1 (*GRB2-Associated Binder1*), SHC (*SH2 domain-containing transforming protein*), SRC, SHP2 (*SRC homology 2 domain-containing phosphatase2*), PLC γ (phospho Lipase γ), STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) ou encore la PI3K (Trusolino et al., 2010). Ces protéines vont se lier à MET de manière directe ou indirecte par le biais de protéines adaptatrices tel que GAB1 et GRB2. Ces dernières sont dépourvues d'activité catalytique mais vont fournir des sites de fixation supplémentaires à d'autres protéines de la signalisation et participer à l'amplification du signal (Figure 8).

L'activation de GAB1, après interaction avec MET, va servir de plateforme pour le recrutement d'autres protéines de la signalisation qui vont à leur tour activer différentes voies de signalisation comme les voies PI3K-AKT et RAS-ERK, qui semblent responsables des principaux phénotypes observés en réponse à l'activation de MET (Bertotti et al., 2009; Maroun et al., 1999; Trusolino et al., 2010; Xiao et al., 2001). D'une part, les tyrosines situées sur la partie C-terminale de GAB1 vont être reconnues par la protéine SHP2 qui va se phosphoryler à son tour et activer la voie des MAPK (Cunnick et al., 2001; Schaeper et al., 2000) (Figure 9). Cette interaction est essentielle pour la réponse de morphogénèse de branchement induite par MET (Schaeper et al., 2000). D'autre part, GAB1 peut recruter la sous-unité p85 de la PI3K (Figure 9). Cette association est cruciale à l'activation de la signalisation PI3K/AKT (Liu and Rohrschneider, 2002). Enfin, en plus de ses domaines de liaison pour SHP2 et p85-PI3K, GAB1 possède d'autres sites de recrutement aux protéines à domaine SH2 comme Crk (*CT10 regulator kinase*) et PLC γ (Figure 9), pour ne citer qu'eux, qui favorisent la morphogénèse (Gual et al., 2000). Plusieurs études ont montré que GAB1 se lie indirectement à MET par l'intermédiaire de GRB2. Toutefois, alors que ce n'est pas le cas pour d'autres RTKs, GAB1 peut également interagir directement avec MET via un motif MBS (*MET binding site*) sur les résidus phosphorylés Y1349 ou Y1356. Cette interaction directe et robuste provoque une phosphorylation prolongée de GAB1 en réponse à l'HGF/SF (Lock et al., 2000; Rodrigues et al., 2000; Schaeper et al., 2000). De plus, il a été montré que GAB1 est la principale protéine phosphorylée suite à la stimulation du récepteur MET dans les cellules épithéliales (Nguyen et al., 1997). Une mutation de MET empêchant la liaison de GAB1 induit une perte de ses capacités à induire la morphogénèse des cellules épithéliales

(Maroun et al., 1999). D'autre part, les embryons de souris déficients en GAB1 présentent les mêmes différences phénotypiques que les embryons déficients en MET démontrant l'importance de GAB1 dans la signalisation du récepteur (Bladt et al., 1995; Sachs et al., 2000; Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995).

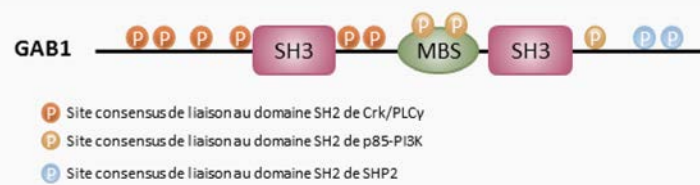


Figure 9 : Représentation schématique de la protéine GAB1 (Tiré de Liu and Rohrschneider, 2002)

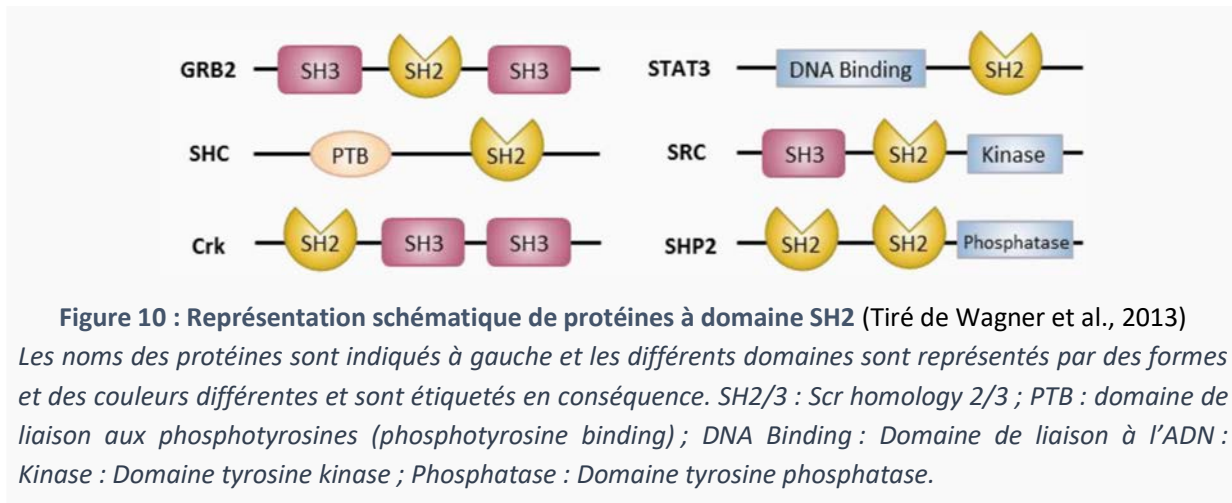
La protéine GAB1 contient deux domaines SH3 (Src Homology 3) encadrant un domaine MBS (Met Binding Domain). De multiples tyrosines (Y) phosphorylables sont disséminées le long de la protéine et représentent des sites potentiels de liaison aux protéines à domaine SH2 comme indiqué sur la figure.

GRB2 est, avec GAB1, l'autre protéine adaptatrice impliquée dans la transmission du signal en aval de MET. Cette protéine possède un domaine SH2 lui permettant de se lier à la Y1356 phosphorylée de MET. Ce domaine SH2 est encadré par 2 domaines SH3 indispensables au recrutement d'autres protéines de la signalisation (Songyang et al., 1994) (Figure 10). GRB2 peut aussi interagir avec le récepteur de manière indirecte *via* la protéine SHC, elle-même recrutée au niveau des deux tyrosines C-terminales de MET *via* son domaine PTB (Pelicci et al., 1995). Ainsi, SHC est considéré comme un amplificateur de la réponse car il augmente les possibilités de GRB2 de se lier à MET (Pelicci et al., 1995). GRB2 est surtout connu pour être capable de recruter les protéines SOS (*son of the sevenless*), activant la voie des Ras/MAP Kinase qui régule préférentiellement la prolifération, ou encore GAB1 *via* ses domaines SH3 qui active diverses cascades de signalisation. Alors que la mutation des Y1349 et Y1356 inhibe complètement la signalisation de MET, la seule mutation de la Y1356 réduit drastiquement les signaux de morphogénèse (Ponzetto et al., 1994, 1996; Zhu et al., 1994). D'autre part, alors que la mutation des deux tyrosines est létale, la mutation de la Y1356 chez la souris permet le développement des fœtus à terme mais ceux-ci présentent une diminution importante de leur masse musculaire au niveau des membres, couplée à un déficit généralisé de fibres secondaires, et meurent quelques heures après la naissance. Ces résultats suggèrent que la signalisation passant par GRB2 joue un rôle dans la myogénèse tardive (Maina et al., 1996). En conclusion, GRB2 est un adaptateur critique pour l'activité du récepteur MET en agissant directement sur la voie RAS/MAPK ou indirectement par l'intermédiaire de GAB1.

La protéine STAT3 est elle aussi recrutée directement par MET *via* son domaine SH2, ou indirectement par l'intermédiaire de GAB1, conduisant à son activation puis à sa dimérisation. Elle va ensuite se transloquer au noyau et agir comme un facteur de transcription favorisant la morphogénèse

et l'invasion cellulaire (Boccaccio et al., 1998; Cramer et al., 2005; Kermorgant and Parker, 2008). La protéine SRC va également interagir avec MET *via* son domaine SH2 et favoriser la croissance sans ancrage (Rahimi et al., 1998) (Figure 10).

Ainsi, de nombreuses protéines participent à la signalisation de MET, soit directement soit indirectement, par l'action de protéines adaptatrices et permettent d'activer un maximum de voies de signalisation dont les voies des RAS/MAPK et PI3K/AKT (Trusolino et al., 2010) (Figure 9).



A.3.3. Exemples des voies de signalisation impliquées :

La voie des RAS/MAPK est l'une des mieux décrites dans la littérature et ses altérations oncogéniques ont été étudiées dans de nombreux articles. Cette voie peut être activée par une grande variété de récepteurs et conduit à l'activation de facteurs de transcription qui favorisent l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Comme évoqué précédemment, suite à l'activation de MET, GRB2 va être recruté et recruter à son tour la protéine SOS capable d'activer la protéine RAS en favorisant la liaison du GTP. RAS va alors changer de conformation et activer en cascade les protéines sérine/thréonine kinases RAF, MEK1/2 et ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*) (McKay and Morrison, 2007). Ces dernières vont activer différents facteurs de transcription comme FOS, JUN, MYC *etc.* notamment impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la prolifération (Turjanski et al., 2007).

La voie PI3K/AKT est une autre voie activée par le couple HGF/SF-MET. La PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*) est composée d'une sous unité catalytique portant l'activité kinase (p110) et d'une sous unité régulatrice (p85) dotée d'un domaine SH2 permettant sa liaison avec des RTKs activés. Elle peut donc être recrutée directement par MET ou par l'intermédiaire de GAB1. Une

fois activée, la PI3K va phosphoryler le PIP2 (*phosphatidylinositol-4,5-diphosphate*) en PIP3 (*phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*) et permettre le recrutement à la membrane plasmique d'autres protéines de la signalisation. Parmi elles on retrouve la protéine AKT qui est capable d'activer un très grand nombre d'effecteurs impliqués dans les mécanismes de prolifération et de survie cellulaire. Pour n'en citer que quelques-uns on retrouve MDM2 (*murine double-minute p53 binding protein*), une ubiquitine ligase qui va séquestrer p53 et s'opposer à l'arrêt du cycle cellulaire, IKK (*I κ B kinase*), qui libère le facteur NF- κ B impliqué dans la survie cellulaire, la prolifération ou encore l'angiogenèse, et BAD (*BCL2-associated agonist of cell death*), qui favorise l'apoptose mais dont l'action est inhibée suite à sa phosphorylation (Hennessy et al., 2005; Moumen et al., 2007). MET agit aussi sur MDM2 au niveau transcriptionnel (Furlan et al., 2011, 2012).

Il existe des interconnexions majeures entre les différentes voies de signalisation. Par exemple l'activation de RAS peut activer d'autres kinases que les MAPK comme la PI3K ou la PLC ϵ (phospholipase C ϵ) (Hennessy et al., 2005). D'autre part, la voie des MAPK peut également être activée par la PLC γ qui est équipée un domaine SH2 et qui peut aussi être directement activée par un RTK. De manière globale, la connexion des différentes voies est essentielle au bon fonctionnement d'un organisme.

A.3.4. Internalisation du récepteur et signalisation :

A la suite de sa liaison avec son ligand, MET va être rapidement internalisé dans la cellule par endocytose. Il est bien connu que l'endocytose est l'une des étapes clés de la dégradation du récepteur. Toutefois, des études ont montré que MET pouvait également activer certaines voies de signalisation au cours de son internalisation. Par exemple, dans les endosomes précoces, MET va activer les protéines ERK, provoquer leur relocalisation au niveau de points focaux d'adhésion, par l'intermédiaire de la PKC ϵ , et ainsi favoriser les réponses de migration (Kermorgant et al., 2004) (Figure 10). D'autre part, la présence de MET au niveau d'endosomes périnucléaires semble nécessaire à la translocation de la protéine STAT3 dans le noyau (Kermorgant and Parker, 2008). En effet, dans le cytosol STAT3 est rapidement déphosphorylée par les phosphatases et la présence de MET non loin du noyau va favoriser l'accumulation nucléaire de STAT3. De manière intéressante, l'utilisation d'un traitement bloquant l'internalisation du récepteur provoque l'inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 et de STAT3 (Kermorgant and Parker, 2008). Ces résultats montrent que l'activité de MET ne s'effectue pas exclusivement au niveau de la membrane plasmique mais également au cours de son internalisation, une voie traditionnellement décrite comme stoppant la signalisation par la dégradation du récepteur.

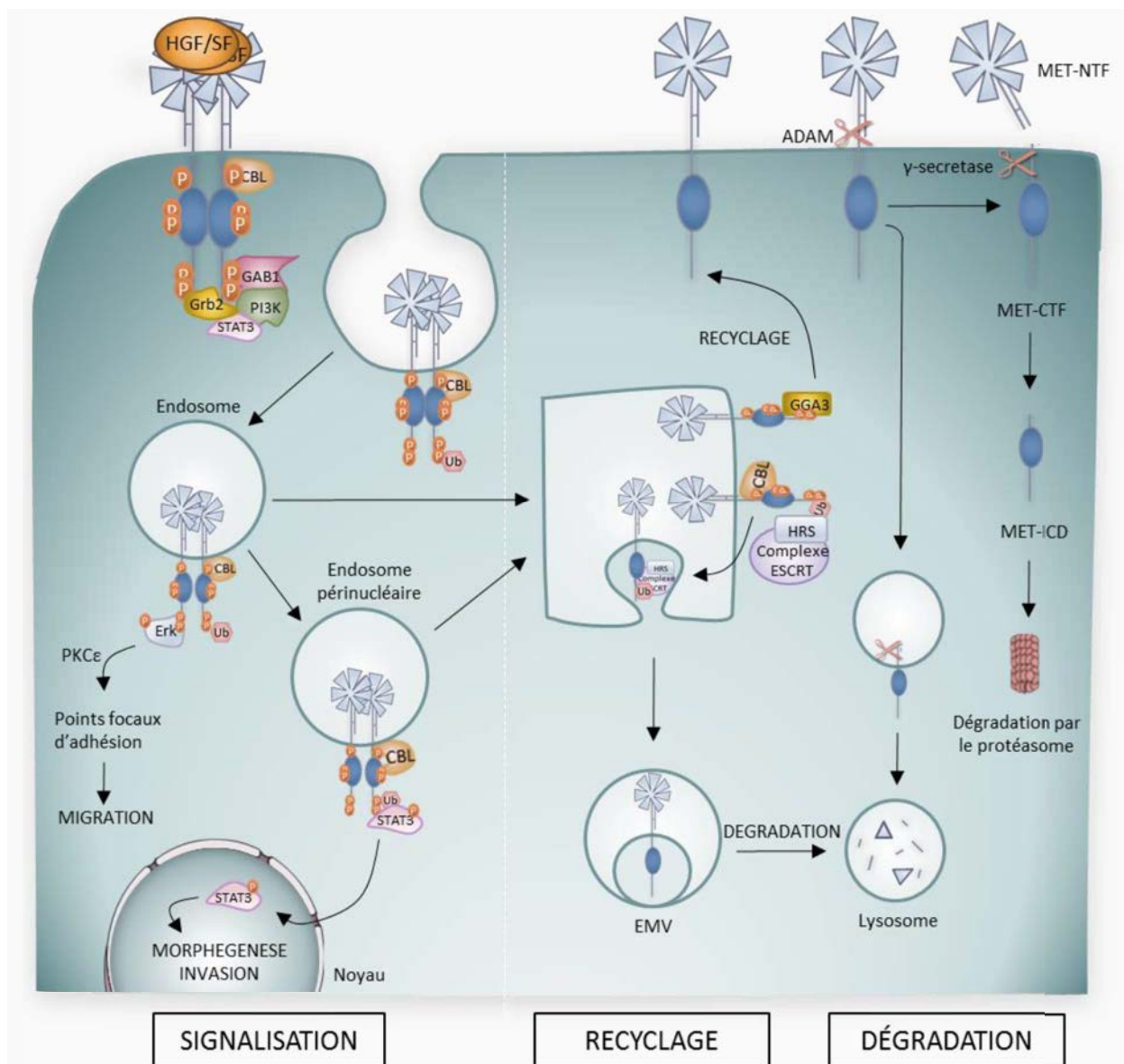


Figure 11 : L'internalisation du récepteur MET : signalisation, recyclage à la membrane et dégradation. Après association avec son ligand, MET se dimérise et s'autophosphoryle. Cette activation va permettre de recruter différentes protéines de la signalisation comme GRB2, GAB1, PI3K et STAT3. La protéine CBL, recrutée au niveau de la Y1003, va ubiquitinyler MET et participer à son internalisation dans la cellule. Dans les endosomes MET est toujours capable d'activer des voies de signalisation. Par exemple, au sein des endosomes précoces, MET va activer les protéines ERK et provoquer leur relocalisation au niveau de points focaux d'adhésion par l'intermédiaire de la PKCε. De la même manière, dans les endosomes périnucléaires, MET favorise la translocation de STAT3 vers le noyau. Dans les endosomes, MET peut suivre deux voies différentes, la voie de la dégradation ou la voie du recyclage à la membrane. L'association de MET avec la protéine GGA3, localisée au niveau du golgi, va participer au recyclage du récepteur à la membrane. Dans le cas de la dégradation, l'ubiquitinylation de MET va être reconnue par la protéine HRS, puis le complexe ESCRT qui vont initier la formation de l'EMV. Les EMV tardifs vont ensuite fusionner avec le lysosome et provoquer la dégradation de MET. MET peut également être dégradé suite à l'action des métalloprotéases ADAM et des γ-sécrétases. Le premier clivage provoque la perte du domaine extracellulaire (MET-CTF) générant ainsi un fragment cytosolique ancré à la membrane plasmique (MET-CTF). MET-CTF est ensuite clivé à son tour libérant dans le cytosol le fragment MET-ICD qui sera efficacement dégradé par le protéasome. Le fragment MET-CTF peut aussi être internalisé puis dégradé par le lysosome.

A la suite de son internalisation, le récepteur est soit dégradé, soit recyclé (Figure 10). La dégradation de MET, qui sera détaillée dans le prochain paragraphe, passe par son ubiquitinylation par la protéine CBL (*Casitas B-cell Lineage*), une E3-ubiquitin ligase. Cette modification post-traductionnelle va être reconnue par les protéines HRS (*HGF regulated tyrosine kinase substrate*) puis par le complexe ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) qui provoquent l'invagination des endosomes pour former des endosomes multivésiculaires (EMV). Ces EMV vont par la suite évoluer en endosomes tardifs puis fusionner avec un lysosome (Abella et al., 2005; Hammond et al., 2003). En opposition, l'endocytose de MET peut également mener à son recyclage à la membrane *via* l'action de la protéine GGA3 (*golgi-localized γ -ear-containing Arf-binding protein3*) qui est localisée au niveau du golgi. L'extinction de la protéine GGA3 est corrélée avec une augmentation de la dégradation de MET, une baisse de l'activité de la voie ERK1/2 et résulte en une diminution de la migration cellulaire (Lefebvre et al., 2012; Parachoniak et al., 2011).

A.4. Régulation du récepteur

Il existe plusieurs mécanismes de régulation capables d'empêcher l'activation prolongée du récepteur MET, qui pourrait conduire à l'émergence d'un processus oncogénique. Le domaine juxtamembranaire de MET possède deux sites de régulation négative, un site composé de la Y1003 permettant de recruter l'E3-ubiquitin ligase CBL responsable de sa dégradation lysosomale et un site composé de la S985 inhibant l'activité kinase de MET. Ces deux mécanismes de régulation sont dépendants de l'activation de MET par son ligand. Toutefois, notre équipe a montré que MET pouvait également être régulé de façon indépendante au ligand suite à différents clivages protéolytiques.

A.4.1. Le rôle de la tyrosine 1003

Parmi les différents mécanismes impliqués dans la régulation du récepteur, le rôle de la Y1003 est actuellement le mieux décrit. Cette tyrosine, située dans le domaine juxtamembranaire, joue un rôle crucial dans le recrutement de CBL qui est responsable de l'ubiquitination du récepteur. En effet, il a été démontré que le domaine TKB (*tyrosine kinase binding* ou PTB) de CBL peut se lier directement à la Y1003 de MET suite à la reconnaissance du motif DpYR. Une mutation de ce motif mène à un défaut d'ubiquitination de MET et est associé à une augmentation de sa stabilité lui conférant des capacités transformantes (Peschard et al., 2001, 2004). *In vivo*, la mutation de la Y1003 favorise la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffes. Ces résultats montrent l'importance de la régulation par CBL comme frein au potentiel oncogénique de MET (Abella et al., 2005) (Figure 11).

A.4.2. Le rôle de la Sérine 985

La sérine 985 est, elle aussi, située sur le domaine juxtamembranaire de MET, non loin de la Y1003. La sérine 985 va être phosphorylée par les protéines PKC δ et ϵ (*protein kinase C*) dont l'action va être dépendante de l'environnement cellulaire. Par exemple, l'induction d'un stress oxydatif favorise la phosphorylation de la S985 par la PKC (Hashigasako et al., 2004). Cette phosphorylation a été associée à une diminution de la phosphorylation des tyrosines du récepteur MET (Gandino et al., 1994). Toutefois, les mécanismes impliqués dans cette régulation négative sont encore mal connus. En culture, un traitement à l'HGF est associé à une phosphorylation transitoire et faible de la S985 qui n'empêche pas la phosphorylation des tyrosines impliquées dans la signalisation de MET. A l'inverse, un traitement favorisant l'activation de la PKC va stimuler la phosphorylation de la S985 et inhiber la phosphorylation des tyrosines, et ce, même en présence d'HGF (Hashigasako et al., 2004). Une autre étude a montré que la phosphorylation de la S985 permet d'inhiber les effets mitogènes de l'HGF mais également de favoriser l'endocytose de MET empêchant ainsi son interaction avec son ligand (Nakayama et al., 2013). Enfin, ce mécanisme semble également jouer un rôle *in vivo* car une diminution de la phosphorylation de la S985 associée à une augmentation de la phosphorylation des tyrosines ont été observées lors du processus de régénération hépatique favorisant ainsi les réponses pro-survie de MET (Nakayama et al., 2013).

A.4.3. Le rôle des phosphatases

Les phosphatases sont des enzymes capables de retirer par hydrolyse le groupement phosphate d'une molécule. Par exemple, l'activation de la S985 peut être reversée par l'action de la phosphatase PP2A permettant un retour à l'état basal. Plusieurs études ont mis en évidence que les phosphatases sont impliquées dans la régulation de nombreux processus cellulaires dont la régulation des RTKs. Parmi elles on retrouve un sous-groupe, les protéines tyrosine phosphatase (PTP), impliquées dans la déphosphorylation des tyrosines. Par exemple, la PTPB1 (*protein-tyrosine phosphatase 1B*), qui fait partie de ce groupe, est capable d'interagir avec de nombreux RTKs. L'utilisation d'un siARN contre PTPB1 provoque une stabilisation de la phosphorylation de MET et un retard de sa dégradation prolongeant ainsi sa signalisation. *In vivo*, la perte de PTPB1 augmente également la phosphorylation de MET. Ces résultats montrent que PTPB1 est bien un régulateur négatif du récepteur MET (Sangwan et al., 2008, 2011). D'autres PTP participant à la régulation de MET ont été décrites comme la TCPTP (*T-cell phosphatase*), la DEP-1 ou encore la RPTP- β (Palka et al., 2003; Sangwan et al., 2008; Xu et al., 2012).

A.4.4. Les clivages du récepteur

MET peut également être régulé par des clivages protéolytiques indépendamment de son activation par l'HGF/SF. De façon constitutive, et comme de nombreuses protéines transmembranaires, MET peut être clivé dans sa région extracellulaire par des métalloprotéases de la famille des ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*). Ce clivage induit la création d'un fragment N-terminal, nommé MET-NTF (*N-terminal fragment*), qui est libéré dans le milieu extracellulaire et d'un fragment C-terminal, toujours ancré dans la membrane plasmique, le fragment MET-CTF (*C-terminal fragment*). MET-CTF va subir un nouveau clivage dans sa région juxtamembranaire par les γ -secretases libérant un fragment dans le cytosol, le fragment MET-ICD (*intracellular domain*), qui sera dégradé par le protéasome. Ce processus, appelé le PS-RIP (*presenilin-regulated intramembrane proteolysis*), va induire la dégradation du récepteur indépendamment de sa liaison au ligand et ainsi contrôler la signalisation de MET (Ancot et al., 2012; Foveau et al., 2009) (Figure 11). Il a également été montré *in vivo* que l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la région extracellulaire de MET, le DN30, favorise la dégradation de MET par le processus PS-RIP réduisant ainsi la croissance tumorale (Foveau et al., 2009; Petrelli et al., 2006). D'autre part, le clivage par les métalloprotéases peut aussi survenir au sein des endosomes et conduire à une dégradation de MET par le lysosome (Figure 11). Ainsi, ces clivages vont contribuer à réduire le temps de demi-vie de MET et prévenir son accumulation à la membrane plasmique.

D'autre part, dans des conditions de nécrose calcium-dépendante MET peut être clivé par les calpaïnes au niveau de son domaine juxtamembranaire. Les calpaïnes sont des protéases calcium-dépendantes capables de cliver de nombreux substrats (Billger et al., 1988). Ainsi, le clivage de MET aboutit à la libération dans le cytosol d'un fragment de 40 kDa nommé p40MET-calpaïnes (Montagne et al., 2015). Même si le rôle de ce fragment est encore inconnu à ce jour, la séparation du domaine de liaison au ligand et du domaine kinase va empêcher l'activation du récepteur et bloquer les réponses de survie.

A.4.5. La face cachée du récepteur MET

Nous avons vu jusqu'à présent que l'activation de MET par son ligand déclenche l'activation de nombreuses voies de signalisation menant à la survie, la prolifération ou encore la migration cellulaire. De manière surprenante, en plus de son rôle pro-survie, notre équipe a démontré que MET pouvait également favoriser l'apoptose (Foveau et al., 2007; Lefebvre et al., 2013; Tulasne et al., 2004). La signalisation pro-apoptotique du récepteur survient uniquement en l'absence de son ligand et sous l'effet d'un stress. Dans ces conditions, MET va être clivé par les caspases au niveau juxtamembranaire et C-terminal permettant la libération dans le cytosol d'un fragment de 40 kDa nommé p40MET. De

précédents articles publiés par l'équipe ont montré que ce fragment est capable d'amplifier le phénomène d'apoptose en induisant la perméabilisation des membranes mitochondriales (Lefebvre et al., 2013) (Figure 12). Ainsi, la mitochondrie va libérer son contenu comprenant de multiples facteurs pro-apoptotiques comme le Cytochrome C (formant l'apoptosome). La perméabilisation des membranes mitochondriales est généralement considérée comme le point de non-retour dans le déclenchement du processus apoptotique. Les différents mécanismes permettant cette perméabilisation et leurs conséquences seront discutés plus en détail dans la partie III. Cette double capacité de MET à induire la survie en présence de son ligand et la mort cellulaire en son absence nous permet de le classer dans la famille des récepteurs à dépendance.

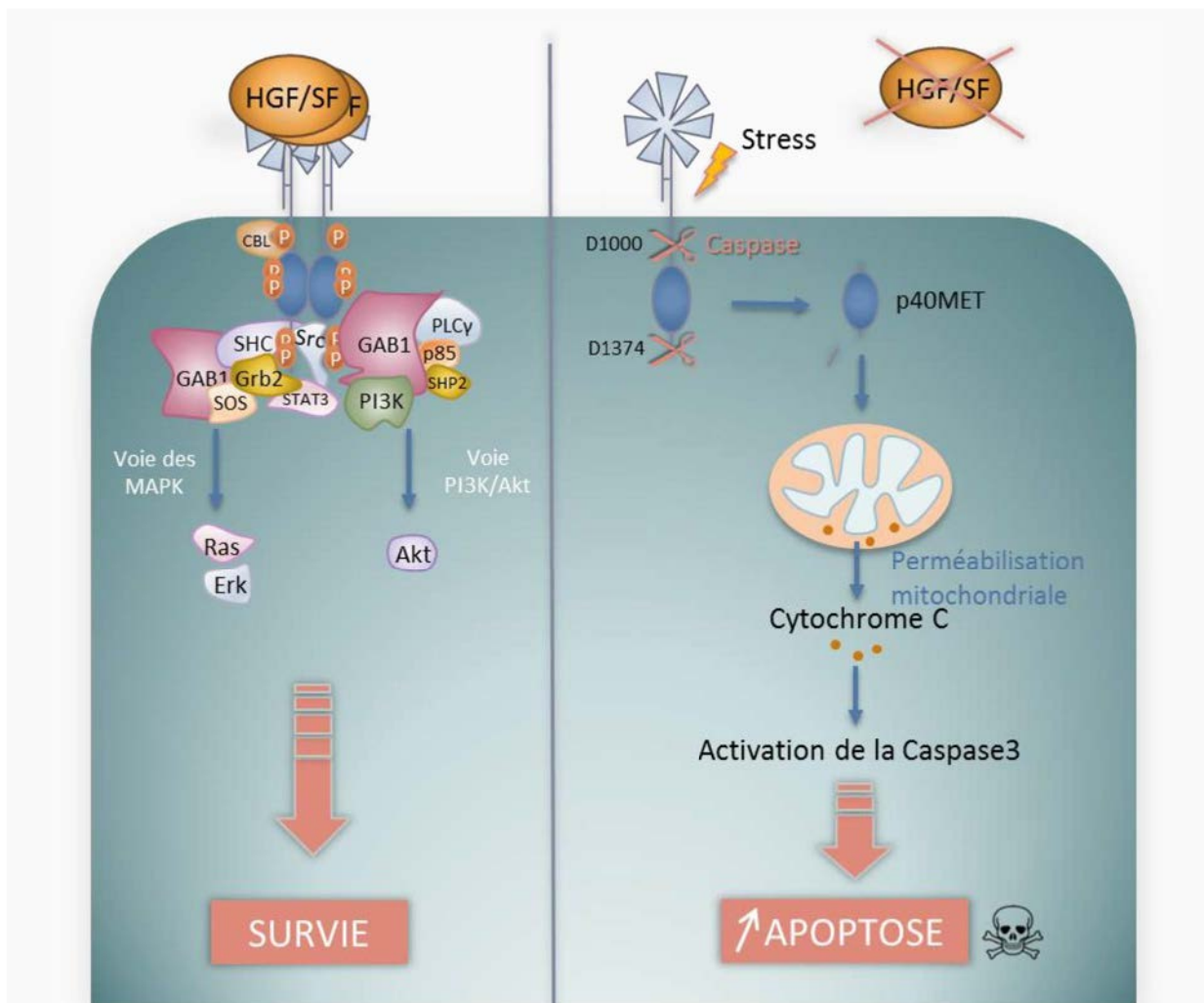


Figure 12 : MET fait partie de la famille des récepteurs à dépendance. En présence d'HGF/SF, le récepteur MET se dimérise et active la signalisation pro-survie, notamment par les voies MAPK et PI3K/AKT. En l'absence de ligand et sous l'effet d'un stress, MET est clivé par les caspases au niveau juxtamembranaire et C-terminal pour générer le fragment p40MET. Ce fragment va provoquer la perméabilisation des membranes mitochondriales responsables de l'amplification de l'apoptose. Ce double rôle fait de MET un récepteur à dépendance. NB : C'est le MET murin qui est illustré ici.

Les clivages de MET ont lieu sur l'acide aspartique 1002 au niveau d'un motif ESVD₁₀₀₂ de la région juxtamembranaire (ESVD₁₀₀₀ chez la souris) et sur l'acide aspartique 1376 ou 1380 de l'extrémité C-terminale, sur un site consensus dupliqué DNAD₁₃₇₆DEV₁₃₈₀ (DNID₁₃₇₄ chez la souris). En effet, les caspases vont reconnaître une séquence de 4 acides aminés suivant le motif XXXD et cliver après le résidu d'acide aspartique. Le premier site de clivage de MET est très conservé tandis que le deuxième va varier entre les espèces et semble présent uniquement chez les mammifères (Tableau 1). On peut noter que chez la souris, modèle sur lequel nous avons travaillé durant ma thèse, le site juxtamembranaire est totalement identique à l'homme avec un clivage qui va s'opérer sur l'acide aspartique 1000 (ESVD₁₀₀₀) alors que le site C-terminal présente un unique motif de reconnaissance par les caspases (DNID₁₃₇₄). Tandis que le clivage juxtamembranaire va permettre la libération d'un fragment du récepteur MET dans le cytosol, le clivage C-terminal ne va éliminer que quelques acides aminés (5 chez la souris et 10 chez l'homme). Toutefois, une étude réalisée dans le laboratoire a montré que la perte de la queue C-terminale était cruciale pour permettre à p40MET de favoriser l'apoptose *in vitro*. Autrement dit, un fragment p40MET qui possède toujours sa queue C-terminale perd ses capacités apoptotiques (Foveau et al., 2007). L'importance du clivage C-terminal pourrait expliquer pourquoi le motif de reconnaissance par les caspases est dupliqué chez l'Homme et les grands singes (Tableau 1).

Tableau 1 : Alignement des sites de clivage par les caspases de MET chez différentes espèces. Les sites de clivage sont représentés en bleu : ESVD pour le domaine juxtamembranaire et DXXD pour le site C-terminal. Le site de reconnaissance de CBL (D_{YR}), nécessaire pour la dégradation de MET, est souligné.

Espèce	UniProt Database	séquence juxtamembranaire	séquence C-terminale
<i>Homo sapiens</i> (humain)	P08581	SVSPTTEMVSN ESVD <u>Y</u> RATFPEDQ	LLSSE DNAD DEVDRPASFWETSstop
<i>Pan troglodytes</i> (chimpanzé)	Q2QLF1	SVSPTTEMVSN ESVD <u>Y</u> RATFPEDQ	LLSSE DNAD DEVDRPASFWETSstop
<i>Canis familiaris</i> (chien)	Q75ZY9	SVSPTTEMVSN ESVD <u>Y</u> RATFPEDQ	LLSSQ DNID GEGDTstop
<i>Sus scrofa</i> (cochon)	Q2QLE0	SVSPTTEMVSS EPVD <u>Y</u> RATFPEDQ	LLSSQ DNVD GEGDTstop
<i>Rattus norvegicus</i> (rat)	P97523	SVSPTTEMVSN ESVD <u>Y</u> RATFPEDQ	LLPSQ DNID GEANTstop
<i>Mus musculus</i> (souris)	P16056	SVSPTTEMVSN ESVD <u>Y</u> RATFPEDQ	LLPSQ DNID GEGNTstop
<i>Xenopus laevis</i> (xénope)	Q9W650	SISPTTEMVSS ESVD <u>Y</u> RSTVQEDP	LLSPEGNIEFSIDTstop
<i>Danio rerio</i> (poisson zèbre)	Q64GK4	SVSPTDEMESH ESVD <u>Y</u> RTTLLEDQ	SLISSQSNLDRDstop

Il est également à noter, que le résidu Y1003, crucial pour la dégradation du récepteur, est adjacent au motif ESVD. D'ailleurs, le résidu D1002 fait partie intégrante du motif D_{YR} reconnu par CBL (ESVD₁₀₀₂Y₁₀₀₃R). Une étude réalisée dans le laboratoire a montré que la phosphorylation du résidu Y1001 (séquence murine, Y1003 chez l'homme) empêche le clivage par les caspases (Deheuninck et al., 2009). Ces données démontrent que l'activation de MET par son ligand rend impossible l'activation de ses capacités apoptotiques. L'inverse est aussi vrai car le clivage de MET rend impossible son

activation par l'HGF/SF puisque le domaine de liaison au ligand est séparé du domaine kinase. De plus, le fragment de MET qui possède le domaine extracellulaire et qui reste ancré à la membrane pourrait servir de leurre à l'HGF/SF et ainsi favoriser la mort cellulaire (Deheuninck et al., 2008; Tulasne and Foveau, 2008).

En conclusion, le récepteur MET est capable d'activer de nombreuses voies de signalisation qui ont un impact important sur les réponses cellulaires. Il est donc nécessaire de réguler son activité afin de prévenir une réponse anarchique pouvant conférer aux cellules des capacités transformantes. Certains mécanismes de régulation sont amorcés à la suite de l'activation du récepteur. D'autres mécanismes, comme l'action des phosphatases et les clivages par les métalloprotéases sont des mécanismes communs entre les différents RTKs et peuvent s'opérer indépendamment de l'activation du récepteur. Enfin, en absence de ligand et sous l'effet d'un stress cellulaire, MET va être clivé par les caspases empêchant ainsi l'activation de sa signalisation pro-survie. De plus le fragment cytosolique généré ne va pas rester inactif mais va favoriser la mort des cellules par apoptose.

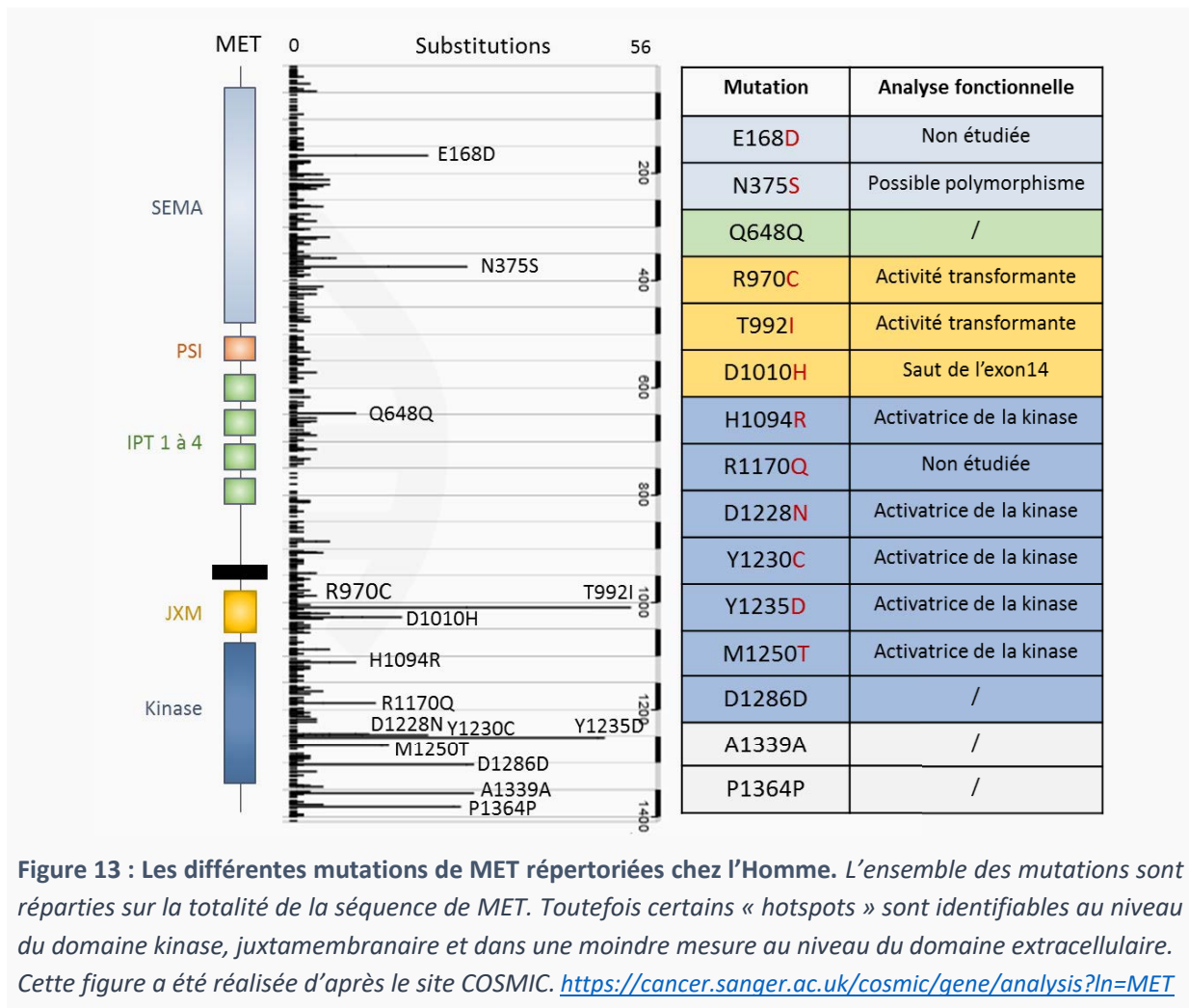
B – Les différents types de dérégulation du couple HGF/SF-MET dans les cancers

Malgré l'existence de nombreux mécanismes de régulation, une dérégulation de la signalisation de MET ou de son expression, causée par diverses altérations moléculaires, ont été décrites dans de nombreux types de cancers. Ces altérations sont majoritairement dues à des mutations, une amplification génique du récepteur ou une surexpression de son ligand.

B.1. Les mutations du récepteur MET

La première mutation de MET a été identifiée en 1997 dans un carcinome rénal papillaire héréditaire et a fourni les premières preuves reliant MET à l'oncogenèse (Schmidt et al., 1997). Depuis, plus de 1200 mutations distinctes de MET, touchant divers types de cancers, ont été répertoriées et regroupées sur le site COSMIC (*catalogue of somatic mutations in cancer*). La majorité de ces mutations sont des mutations faux-sens (69%), des mutations silencieuses (13%) ou des délétions en phase (5%). Il est à noter que même si ces mutations ont été décrites dans des cas de cancers leur implication dans le processus oncogénique n'est pas systématique, comme le montre la présence de mutations silencieuses. En effet, il y a une différence entre une mutation répertoriée et une mutation véritablement caractérisée. L'étude fonctionnelle des mutations reste nécessaire pour vérifier leur

implication dans la tumorigenèse. Les mutations répertoriées sont réparties sur l'ensemble de la séquence de MET. Toutefois, il existe certains « hotspots » où la fréquence des mutations augmente. C'est le cas au niveau du domaine kinase et juxtamembranaire et dans une moindre mesure au niveau du domaine extracellulaire (Figure 13). Les mutations, dont le rôle dans le processus oncogénique est avéré, vont majoritairement conduire à l'activation constitutive du récepteur ou empêcher sa dégradation.



B.1.1. Les mutations du domaine kinase

Le lien entre l'altération de MET et le développement tumoral a été établi en premier lieu grâce à l'identification de mutations situées sur le domaine kinase de MET dans les carcinomes papillaires rénaux (mutations germinales ou somatiques) puis dans les cancers des voies aérodigestives supérieures (mutations somatiques) (Jeffers et al., 1998; Schmidt et al., 1997). Ces mutations sont des mutations faux-sens qui vont conduire à l'activation constitutive du récepteur sans ligand, telles que la D1228N, la Y1230C et la M1250T (Jeffers et al., 1997; Joffre et al., 2011) (Figure 13). Certaines

mutations, dont les mutations D1228N et M1250T, vont non seulement activer le récepteur mais aussi favoriser son recyclage à la membrane plasmique (Joffre et al., 2011).

Leur implication dans la tumorigenèse a été évaluée dans des souris KI les exprimant. De manière intéressante, la nature de la tumeur obtenue diffère en fonction des mutations. Par exemple, les souris exprimant la mutation MET M1248T (M1250T chez l'homme) ont montré le développement de carcinomes ou de lymphomes à une fréquence élevée, tandis que les souris MET D1226N et Y1228C (D1228N et Y1230C chez l'homme) ont principalement développés des sarcomes et des lymphomes (Graveel et al., 2004). Chez l'homme, ces mutations du domaine kinase peuvent affecter jusqu'à 15% de patients atteints d'un cancer papillaire rénal (Durinck et al., 2015) (Figure 14).

B.1.2. Les mutations du domaine juxtamembranaire

D'autres mutations ont été décrites au niveau du domaine juxtamembranaire de MET dont les conséquences fonctionnelles sont, là aussi, peu connues. Ces mutations pourraient être un simple polymorphisme car dans certains cas elle sont retrouvées dans la lignée germinale (Lee et al., 2000). Pourtant, nous avons évoqué tout à l'heure que le domaine juxtamembranaire de MET jouait un rôle très important dans la régulation des fonctions catalytiques. De plus, des données fonctionnelles montrent que certaines de ces mutations sont impliquées dans la tumorigenèse. Par exemple, les mutations les plus fréquentes sont les mutations R970C, P991S et T992I retrouvées notamment dans 3 à 10% des cancers pulmonaires (Boland et al., 2013; Krishnaswamy et al., 2009; Tyner et al., 2010). *In vitro*, ces mutations favorisent la motilité cellulaire, la migration et la croissance sans ancrage, autant de caractéristiques témoignant d'un potentiel métastatique (Lee et al., 2000; Ma et al., 2003). *In vivo*, une équipe a montré que les lignées cellulaires exprimant ces mutants de MET forment des tumeurs plus rapidement que les cellules exprimant le MET sauvage (Lee et al., 2000). D'autre part, notre équipe a montré dernièrement que la mutation R970C favorisait le clivage de MET par les calpaïnes dans le cancer du poumon. Le fragment généré favorise la mobilité et la migration des cellules induite par l'HGF/SF (Montagne et al., 2017). Cependant, ces mutations ne semblent pas induire une activation du domaine kinase de MET (Tyner et al., 2010). De ce fait, la question de savoir si ces mutations jouent bel et bien un rôle dans la tumorigenèse reste controversée.

B.1.3. Les mutations conduisant au saut de l'exon 14

Récemment, des séquençages complets de MET issus d'échantillons tumoraux ont montré qu'un grand nombre de mutations touche les sites d'épissage de l'exon 14, codant pour le domaine

juxtamembranaire, et conduit au saut en phase de cet exon. Une étude par NGS (*next generation sequencing*) de plus de 38000 tumeurs a permis d'identifier 221 cas présentant un saut de l'exon 14 engendré par 126 mutations différentes. Ces résultats soulignent qu'une grande diversité de mutations peut conduire au saut de l'exon 14. Ces mutations sont des mutations ponctuelles, des délétions, des insertions ou des mutations complexes (InDels) touchant le site donneur ou accepteur d'épissage mais également les régions introniques aux abords du site accepteur (Frampton et al., 2015). Ces mutations, provoquant le saut de l'exon 14, ont été répertoriées dans environ 3% des adénocarcinomes pulmonaires (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014; Onozato et al., 2009) (Figure 14). Elles ont également été détectées dans des cellules cancéreuses gastriques et de neuroblastome suggérant qu'elles soient présentes dans une grande variété de tumeurs (Lee et al., 2015; Yan et al., 2013). *In vitro*, des études montrent que la perte de l'exon 14 provoque une diminution de la liaison de CBL, une stabilisation de la protéine et donc une signalisation prolongée de MET. *In vivo*, les cellules exprimant une version de MET délétée de l'exon 14 sont fortement tumorigènes et développent de plus grosses tumeurs (Kong-Beltran et al., 2006; Lee et al., 2006; Togashi et al., 2015). La perte des sites de régulation négative situés sur le domaine juxtamembranaire pourrait expliquer la suractivation du récepteur MET. Ainsi, l'implication des différents sites de régulation négative dans le processus oncogénique fait l'objet d'une thèse dans le laboratoire. Il est important de noter que ces cellules sont sensibles aux inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) de MET *in vitro* (Kong-Beltran et al., 2006; Lee et al., 2006; Togashi et al., 2015). De manière cohérente, plusieurs études montrent des réponses encourageantes aux traitements par TKI de MET chez des patients présentant un saut de l'exon 14 (Frampton et al., 2015; Jenkins et al., 2015; Jorge et al., 2015; Mahjoubi et al., 2016; Paik et al., 2015; Waqar et al., 2015).

Ainsi la détection chez les patients, de mutations touchant les sites d'épissages de l'exon 14 est essentielle. Or jusqu'à présent, les méthodes d'analyses qui ont permis de détecter ces mutations, comme le séquençage complet, ne conviennent pas pour les diagnostics de routine en raison du coût élevé et de la nécessité d'utiliser de gros échantillons tumoraux. C'est pourquoi notre équipe a participé, en collaboration avec le département de Biochimie et de Biologie Moléculaire du CHU de Lille et le plateau de génomique de Lille, à l'optimisation des tests de routine pour détecter les mutations du site d'épissage MET exon 14. Ce travail montre que l'analyse par NGS ciblé et optimisé, combinée avec l'analyse de la longueur du fragment, permet de détecter en routine les mutations du site d'épissage de l'exon 14 de MET chez 2.2% des patients contre 0.3% avec le NGS seul et non optimisé (Descarpentries et al., 2018).

B.1.4. Les mutations du domaine extracellulaire

Concernant les mutations localisées sur le domaine extracellulaire, on retrouve un plus fort taux de mutation au niveau du site codant pour le domaine SEMA. Celui-ci est nécessaire à l'activation du récepteur car il participe à la liaison avec l'HGF/SF. Une mutation de ce domaine, comme la mutation N375S, est particulièrement retrouvée dans les cas de cancers bronchiques à non petites cellules (CBNPC). Toutefois, comme les conséquences fonctionnelles des mutations extracellulaires de MET ne sont pas encore bien établies, leur implication dans la tumorigenèse reste controversée. La mutation N375S, qui est la plus fréquente, induit des changements conformationnels qui diminuent l'affinité de MET pour son ligand. Une autre étude montre que la mutation confère également une résistance à l'apoptose induite par un inhibiteur de l'activité kinase de MET (Krishnaswamy et al., 2009). Cependant, plus récemment, des études ont montré que cette mutation existait au niveau germinale dans la population asiatique et qu'elle n'était pas associée à une susceptibilité au cancer (Liu et al., 2012; Shieh et al., 2013). Cette mutation particulière pourrait donc être simplement le reflet d'un polymorphisme.

B.2. La surexpression de MET

Tandis que les mutations du récepteur ne touchent qu'une proportion limitée de patients, la surexpression de MET a été très fréquemment observée dans certains cancers. Cette surexpression peut s'expliquer par différents mécanismes. Tout d'abord, l'activation de la transcription de MET peut conduire à son accumulation à la membrane plasmique. Il existe des facteurs de transcription, tel que ETS1 ou AP1, capables de se fixer sur le promoteur du gène *MET* et d'induire sa transcription. Il a d'ailleurs été montré que ces facteurs peuvent être surexprimés dans les cancers (Buggy et al., 2004). Les facteurs environnementaux jouent également un rôle dans l'expression de MET. Par exemple, en situation d'hypoxie le facteur HIF1 α (*hypoxia inducible factor1*) est libéré et va augmenter l'expression du récepteur en se fixant directement sur son promoteur. De manière cohérente, une surexpression de MET a été observée dans des régions hypoxiques au sein de tumeurs solides chez la souris mais également dans des échantillons de tumeurs humaines (Pennacchietti et al., 2003). Enfin, certains micro ARN peuvent réguler le taux d'expression de MET en bloquant la traduction de l'ARNm (Giglio and Vecchione, 2015; Karagonlar et al., 2015). Ainsi, leur inhibition induit une surexpression du récepteur.

D'autre part, une baisse de la dégradation a également pour conséquence une surexpression de MET à la membrane. Par exemple, il a été montré que la phosphorylation des Y1349 et 1356 de

MET permet le recrutement de la Tensine4 qui inhibe la dégradation de MET *in vitro* et *in vivo* dans les cancers du côlon et de l'ovaire (Muharram et al., 2014).

Ainsi, on retrouve MET surexprimé dans 10 à 70% des cancers gastriques (An et al., 2014; Di Renzo et al., 1995; Huang et al., 2001; Tang et al., 2004), dans 20 à 70% des cancers du sein (Camp et al.; Ghossoub et al., 1998; Nakopoulou et al.), jusqu'à 70% des CBNPC (Park et al., 2012; Tsao et al., 2001) et jusqu'à 80% des cancers rénaux (Natali et al., 1996). Ces grandes variations de pourcentages s'expliquent par la diversité des techniques utilisées (IHC, RT-PCR ou encore western blot) ainsi que par la définition du seuil de surexpression. Cependant, la corrélation entre la surexpression et l'activation du récepteur n'est pas claire. En effet, alors que des équipes montrent un lien entre la surexpression du récepteur et sa phosphorylation (Copin et al., 2016; Nakamura et al., 2007; Pennacchietti et al., 2003) d'autres n'observent pas cette corrélation, mais plutôt que la surexpression de MET seule ne semble pas être suffisante pour l'activer (Tsuta et al., 2012; Watermann et al., 2015). De plus, plusieurs essais cliniques ont démontré que les inhibiteurs de MET n'apportaient pas d'avantages thérapeutiques lorsque les patients étaient sélectionnés sur la seule base de la surexpression de MET (Scagliotti et al., 2015; Spigel et al., 2017).

En conclusion, même si MET est surexprimé dans une grande variété de cancers, dans la majorité des cas, la surexpression n'entraîne pas de dépendance à l'oncogène. Toutefois, il est important de noter que même si la surexpression de MET n'est pas obligatoirement corrélée à la suractivation du récepteur, elle est souvent associée à un mauvais pronostic (Ghossoub et al., 1998; Go et al., 2010; Guo et al., 2014)

B.3. L'amplification de MET

Dans certains cancers, la suractivation de MET est associée à une amplification génique du récepteur (Cooper et al., 1986; Schildhaus et al., 2015). C'est en 1986 qu'a été observée pour la première fois l'amplification de 4 à 8 fois du nombre de copies du gène *Met* dans des fibroblastes de souris NIH3T3 transformés ayant pour conséquence une augmentation importante de la quantité d'ARNm produit (Cooper et al., 1986). Plus tard, l'amplification de *MET* a été décrite dans de nombreuses lignées cellulaires issues de tumeurs humaines comme les lignées dérivées de tumeurs gastriques (GTL16, Hs746T, MNK45, SNU5, Katoll) ou pulmonaires (EBC-1, H1993). Dans ces lignées, la surexpression de MET est associée à une activation constitutive de l'activité kinase indépendante de sa stimulation par l'HGF/SF (Lutterbach et al., 2007; Smolen et al., 2006). D'ailleurs, pour la lignée Hs746T, l'amplification génique de *MET* est combinée à une mutation conduisant au saut de l'exon 14

(Asaoka et al., 2010). De manière intéressante, dans des lignées de cellules pulmonaires et gastriques avec amplification de MET, l'inhibition de l'activité kinase par l'utilisation d'un TKI tel que le PHA-665752 ou l'inhibition de l'expression de MET par shARN induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1-S et la mort des cellules (Lutterbach et al., 2007; Smolen et al., 2006). Ces résultats montrent que ces cellules sont dépendantes de MET et permettent d'introduire la notion d'addiction oncogénique qui sera abordée dans la partie C.4.

La définition de l'amplification génique de *MET* chez le patient est assez complexe à déterminer et va varier d'une étude à l'autre en fonction de la technique utilisée (*Fluorescence in situ hybridization* (FISH), *comparative genomic hybridization* (CGH), ...) car aucun consensus n'a été établi. De plus, le nombre de copies du gène nécessaire pour provoquer la surexpression de MET et son activation en absence de ligand n'est pas caractérisé. En partant du postulat que *MET* est amplifié si le ratio *MET/CEP7* (nombre de copies de *MET*/nombre de copies du centromère du chromosome 7) déterminé par FISH est supérieur à 2, on le retrouve dans 2 à 5% des patients atteints de CBNPC, de cancers gastriques, de carcinomes hépatocellulaires, de carcinomes du nasopharynx ou de tumeurs gliales (Burel-Vandenbos et al., 2017; Kondo et al., 2013; Lennerz et al., 2011; Li et al., 2015; Park et al., 2015; Pyo et al., 2016; Wang et al., 2013) (Figure 14). Dans la majorité des cas, l'amplification de *MET* est synonyme de mauvais pronostic. Par exemple, les patients atteints d'un cancer gastrique présentant une amplification de *MET* ont un taux de survie global plus court (Catenacci et al., 2017a; Lee et al., 2016; Liu et al., 2014). Dans les gliomes, l'amplification de *MET* est associée à une forte agressivité du cancer et n'est d'ailleurs observée que dans les tumeurs de grade IV (Kwak et al., 2015). Récemment, une étude a montré une bonne réponse au Crizotinib, un TKI de MET, chez deux patients atteints d'un CBNPC avec une amplification de *MET* au ratio *MET/CEP7* ≥ 5 . Chez ces patients, aucun autre driver oncogénique n'a été décrit (Caparica et al., 2017). Cependant, bien que très agressive, une amplification importante de *MET* (*MET/CEP7* ≥ 5) est rare avec une fréquence estimée à seulement 0.34% dans les CBNPC (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014; Noonan et al., 2016). Dans une autre étude, 2 patients sur 4 atteints d'un carcinome gastro-œsophagien avec une amplification importante de *MET* (*MET/CEP7* ≥ 5) ont présenté une sensibilité transitoire au Crizotinib (Lennerz et al., 2011). Par conséquent, la valeur prédictive de l'amplification de *MET* pour l'utilisation de thérapies ciblées nécessite la réalisation d'essais cliniques de plus grande ampleur.

Il est aussi important de noter que l'amplification de *MET* a été décrite comme un mécanisme de résistance aux TKI EGFR chez les patients présentant des mutations activatrices de l'EGFR (Bardelli et al., 2013; Engelman et al., 2007). Par exemple, on retrouve l'amplification de *MET* dans 5 à 20% des patients atteints d'un CBNPC devenus résistants aux TKI EGFR. Pourtant, il n'existe que peu de données sur les conséquences phénotypiques de cette résistance et sur le pronostic de ces patients. Ainsi,

l'étude de ce mécanisme a fait l'objet d'une thèse dans le laboratoire, soutenue par le Dr. Simon Baldacci en décembre 2017. Ce travail a notamment montré que les cellules résistantes aux TKI EGFR par amplification de *MET* acquièrent un phénotype plus agressif qui s'explique par une transition épithélio-mésenchymateuse, augmentant ainsi leur capacité à métastaser (Baldacci et al., in press dans *Lung cancer*).

B.4. La surexpression du ligand

De la même manière que pour le récepteur, on retrouve dans certains cancers une surexpression de l'HGF/SF qui, elle aussi, est un facteur de mauvais pronostic (Ujiie et al., 2012). D'une part, une augmentation de la quantité d'HGF/SF a été observée dans les sérums de patients atteints de cancers du poumon, de l'estomac, du sein, de la prostate, du colon, du rein, dans les mélanomes et dans les gliomes (Arrieta et al., 2002; Gupta et al., 2008; Hügel et al., 2016; Niki et al., 1999; Siegfried et al., 1997; Tanimoto et al., 2008; Toi et al., 1998; Toiyama et al., 2009). D'autre part, une co-expression de MET et de son ligand a été décrite dans des cas de gliomes très agressifs. Il a également été démontré que l'expression d'HGF/SF est plus élevée dans les gliomes de haut grade, c'est-à-dire à évolution rapide, comparé aux gliomes de bas grade (Koochekpour et al., 1997; Lamszus et al., 1998). Ces résultats suggèrent que dans les gliomes, les cellules tumorales pourraient produire elle-même de l'HGF/SF et activer le récepteur de manière autocrine (Figure 14). Ainsi, la sécrétion d'HGF/SF ne serait pas seulement due aux cellules de l'environnement tumoral. Il existe plusieurs lignées cellulaires présentant une sécrétion autocrine d'HGF/SF, principalement dérivées de gliomes humains, comme les lignées U87MG et U118 (Koochekpour et al., 1997; Rosen et al., 1996). Ces dernières sont particulièrement agressives. Une xénogreffe intracrânienne de ces cellules sécrétant de l'HGF/SF va engendrer le développement de plus grosses tumeurs chez la souris en comparaison avec des cellules n'exprimant pas l'HGF/SF (Laterra et al., 1997). L'inhibition de la signalisation de MET par l'utilisation d'un anticorps bloquant l'HGF/SF ou par TKI inhibe la prolifération cellulaire dans ces lignées (Koochekpour et al., 1997; Zhang et al., 2013). Ces résultats étayent, là encore, la notion d'addiction au récepteur MET.

D'autre part, il semblerait que la surexpression du ligand de MET soit également un mécanisme de résistance. Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont permis de mettre en évidence que l'activation des voies de signalisation de MET, suite à son interaction avec l'HGF/SF, peut effectivement induire une résistance aux TKI EGFR (Turke et al., 2010; Yano et al., 2008). De manière cohérente, une augmentation du taux d'HGF/SF a été observé chez 60% des patients atteints de CBNPC devenus résistants aux TKI EGFR (Yano et al., 2011).

B.5. Les réarrangements chromosomiques

Comme évoqué précédemment, le récepteur MET a été découvert dans la lignée d'ostéosarcome humain HOS traités par un carcinogène chimique (Cooper et al., 1984). À la suite de ce traitement, un réarrangement chromosomique induit la fusion du gène *TPR* avec le gène *MET*. La protéine issue de cette fusion possède le domaine kinase de MET et le site de dimérisation de TPR et induit l'activation constitutive de la chimère responsable de son activité transformante *in vitro* et dans des modèles murins (Peschard and Park, 2007). Cependant, comme cette protéine chimère n'a jamais été observée dans des tumeurs humaines, la question se posait de savoir si des fusions de MET pouvaient être impliquées dans la tumorigenèse chez l'homme (Heideman et al., 2001).

Tout récemment, grâce au développement des techniques de séquençage haut débit, des fusions de MET ont été décrites à partir d'ARN tumoraux issus de divers cancers. En 2014, le séquençage de l'ARN tumoral de 272 patients atteints d'un glioblastome a révélé l'existence d'une fusion de *MET* avec le gène *PTPRZ1* (*receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta*) (Figure 14). Cette fusion était présente dans un gliome astrocytaire de grade III (1/13) et dans 3 glioblastomes secondaires de grade IV (3/20). La protéine PTPRZ1-MET est composée de la totalité de MET et d'une partie ou de la totalité de la protéine PTPRZ1. *In vitro*, la fusion PTPRZ1-MET est responsable de l'augmentation de la phosphorylation de MET et de la migration cellulaire (Bao et al., 2014; Chen et al., 2015). Deux ans plus tard, deux nouvelles fusions de MET ont été décrites dans des glioblastomes pédiatriques impliquant les gènes *TFG* (*Trk-fused gene*) et *CLIP2* (*CAP-Gly domain Containing Linker Protein 2*) (International Cancer Genome Consortium PedBrain Tumor Project, 2016). Contrairement à la fusion PTPRZ1-MET, les fusions TGF-MET et CLIP2-MET ne contiennent que le domaine kinase de MET. Il est intéressant de noter que l'utilisation d'un TKI de MET chez un patient atteint d'un glioblastome exprimant la fusion PTPRZ1-MET a entraîné une diminution notable de la tumeur ainsi que des symptômes associés (International Cancer Genome Consortium PedBrain Tumor Project, 2016). Dans le mélanome, d'autres fusions sont aujourd'hui décrites mais présentes à une faible fréquence (moins de 1%). Ces fusions possèdent toutes le domaine kinase de MET fusionné à la partie N-terminale de partenaires tel que ZKSCAN1, PPFIBP1, TRIM4, LRRFIP1, EPS15 et DCTN1 (Figure 14). De façon prévisible, ces fusions sont constitutivement actives et induisent la formation de tumeurs dans des modèles de xénogreffes. L'utilisation de TKI de MET sur des cellules exprimant les fusions ZKSCAN1-MET et TRIM4-MET permet une baisse de la phosphorylation de MET et des voies de signalisation en aval (Yeh et al., 2015). Enfin, une fusion HLA-DRB1-MET (*major histocompatibility complex, class II, DR beta 1*) a été trouvée chez un patient atteint d'un adénocarcinome pulmonaire chimio-résistant. Cette protéine chimère possède uniquement le domaine kinase de MET. Le

traitement de ce patient par TKI de MET a montré une résolution complète des nodules précédemment observés et un maintien de la réponse pendant au moins 8 mois (jusqu'à la date de publication de l'étude) (Davies et al., 2017). Ces résultats suggèrent, encore une fois, l'existence de tumeurs avec une addiction au récepteur MET.

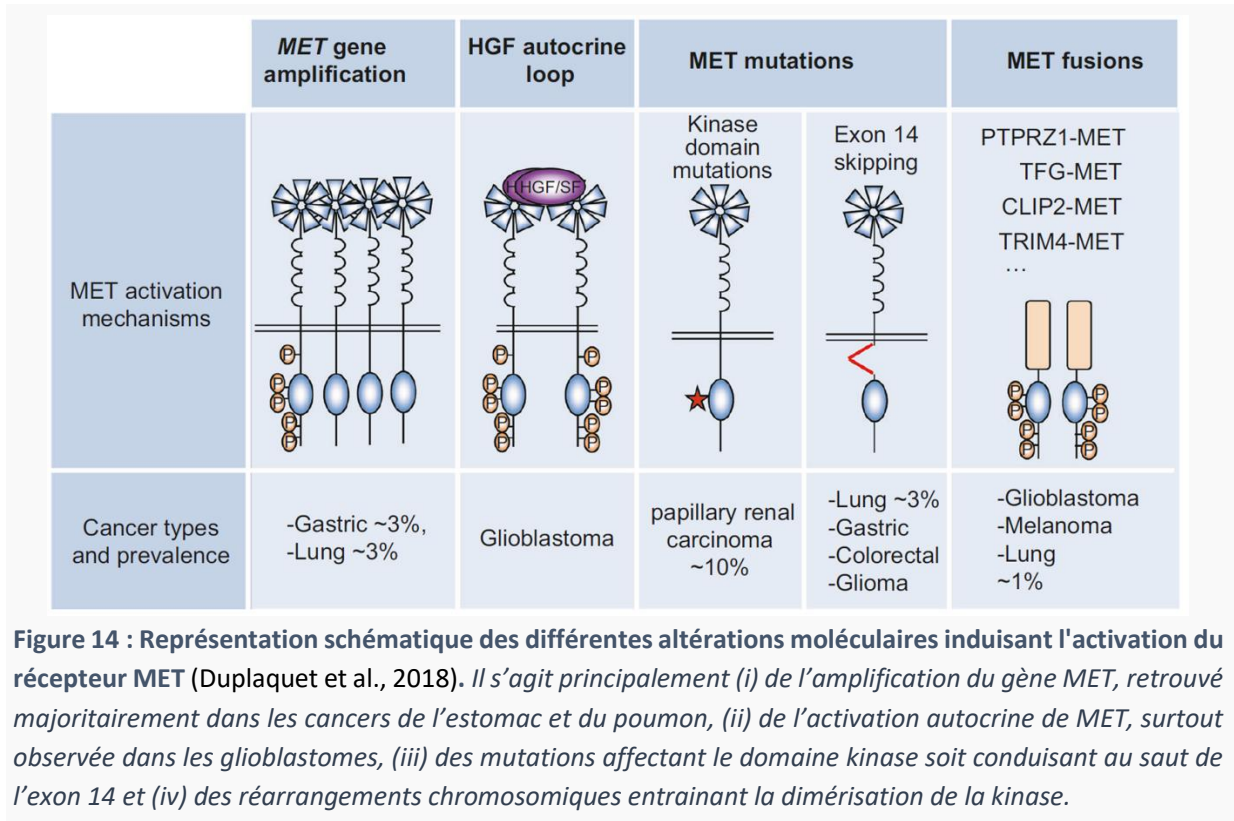


Figure 14 : Représentation schématique des différentes altérations moléculaires induisant l'activation du récepteur MET (Duplaquet et al., 2018). Il s'agit principalement (i) de l'amplification du gène MET, retrouvé majoritairement dans les cancers de l'estomac et du poumon, (ii) de l'activation autocrine de MET, surtout observée dans les glioblastomes, (iii) des mutations affectant le domaine kinase soit conduisant au saut de l'exon 14 et (iv) des réarrangements chromosomiques entraînant la dimérisation de la kinase.

C – Les stratégies thérapeutiques

Comme évoqué précédemment, de nombreuses molécules ciblant le couple HGF/SF-MET sont actuellement en cours de développement. Ces stratégies visent notamment à perturber l'interaction de MET avec l'HGF à l'aide d'anticorps bloquants ou de molécules antagonistes, ou à inhiber l'activité kinase de MET par le biais de TKI (Figure 15) (Furlan et al., 2014).

C.1. Les inhibiteurs du domaine kinase de MET ou multi-kinase

Les TKI (*tyrosine kinase inhibitor*) sont de petites molécules capables de se fixer de manière compétitive sur les sites de liaison de l'ATP des RTKs ce qui a pour conséquence de bloquer leur activation. Certains de ces inhibiteurs sont spécifiques à une cible, comme le Gefinitib pour l'EGFR, alors que d'autres ont un spectre d'action plus large et peuvent bloquer plusieurs protéines cibles (Scagliotti et al., 2013). Cette caractéristique est intéressante car l'oncogenèse est souvent contrôlée

par de multiples médiateurs. Ainsi, les TKI multi-cibles permettent d'envisager des stratégies d'inhibition de plusieurs voies par une seule molécule thérapeutique (Ardizzoni and Tiseo, 2007).

Le PHA-665752 fait partie des premiers TKI décrits ciblant le récepteur MET. Cet inhibiteur est spécifique de MET et va inhiber de manière compétitive la liaison de l'ATP au domaine tyrosine kinase. Malgré de très bons résultats sur l'inhibition de la signalisation de MET *in vitro* et sur la réponse anti-tumorale dans des modèles animaux, sa forte toxicité hépatique et rénale ne permet pas son utilisation en clinique (Christensen et al., 2003). Il reste tout de même largement utilisé en recherche. Depuis, un grand nombre de TKI présentant une meilleure tolérance ont été mis au point.

Le Crizotinib par exemple, est un TKI ciblant MET, ALK (*anaplastic lymphoma kinase*), ROS1 et RON. Initialement, ce TKI est utilisé en clinique, car particulièrement efficace, chez des patients atteints de CBNPC avec une translocation de ALK. Son activité multi-cibles pourrait être un avantage car il permettrait, en plus d'inhiber l'action de ALK, de réduire les risques de survenue d'une résistance impliquant MET (Gridelli et al., 2014). Désormais, il est aussi prescrit en tant qu'inhibiteur de MET chez les patients atteints d'un CBNPC avec amplification de MET (Camidge et al., 2014; Ou et al., 2011). Son action a également fait ses preuves dans des cas cliniques sur des patients présentant des translocations de MET (Davies et al., 2017; International Cancer Genome Consortium PedBrain Tumor Project, 2016).

Un autre TKI multi-cible, le Foretinib, est capable de bloquer MET et le récepteur VEGFR2 avec une haute affinité. Un essai clinique de phase II, chez des patients atteints d'un cancer papillaire rénal présentant ou non une activation de MET, a montré que ce TKI a une meilleure efficacité chez des patient présentant des mutations germinales de MET, telle que la mutation H1094R en comparaison avec des patients ne présentant aucune ou d'autres modifications de MET (Choueiri et al., 2013). Ces résultats suggèrent que la présence de mutations germinales sont prédictives d'une réponse au Foretinib, contrairement aux autres altérations. Un autre essai clinique de phase II chez 74 patients atteints d'un adénocarcinome gastrique, dont 3 présentaient une amplification de MET, a montré que la meilleure réponse au Foretinib a été une stabilisation de la maladie pour 23% des patients. Parmi les 3 patients avec une amplification de MET, un a répondu au traitement avec une stabilisation de la maladie. Ces résultats démontrent l'importance de sélectionner les patients et de trouver des biomarqueurs prédictifs de l'efficacité d'un TKI (Shah et al., 2013).

C.2. Les anticorps bloquants dirigés contre MET ou l'HGF

Le développement d'anticorps monoclonaux bloquants est une autre stratégie d'inhibition de la voie HGF/SF-MET. Ces anticorps vont cibler spécifiquement MET ou son ligand afin de bloquer leur interaction. Parmi eux on retrouve le Rilotumumab, l'Onartuzumab, le Ficlatusumab et l'Emibetuzumab. Le Rilotumumab (AMG102) est un anticorps monoclonal humanisé qui va reconnaître le domaine SPH de l'HGF/SF et empêcher sa liaison de l'HGF/SF au récepteur MET et son activation. Cette stratégie d'inhibition a été principalement étudiée dans les cancers gastriques et de l'œsophage. Après des résultats prometteurs d'études précliniques et cliniques, l'étude de phase III RILOMET-1 montre une baisse de la médiane de survie globale chez des patients atteints d'un cancer gastrique traités avec le Rilotumumab combiné avec de la chimiothérapie en comparaison avec un placebo et de la chimiothérapie (Catenacci et al., 2017b; Iveson et al., 2014). Cependant, dans cette étude les patients ont été discriminés par le niveau d'expression de MET déterminé par IHC. Ainsi, 81% des patients étaient considérés comme positifs pour la surexpression de MET. Or, nous avons vu précédemment que la surexpression de MET n'était pas obligatoirement corrélée à la suractivation du récepteur et que dans la majorité des cas elle ne conduit pas à une dépendance au récepteur. De plus, la surexpression de MET par amplification génique (qui est une altération moléculaire pouvant conduire à une dépendance à MET) représente environ 2 % des adénocarcinomes gastro-œsophagiens (Lennerz et al., 2011). Un chiffre qui est bien loin des 81% retrouvés dans cette cohorte ce qui suggère que, pour peu de patients, la surexpression de MET est provoquée par une amplification génique. D'autre part, ces résultats négatifs pourraient également s'expliquer par un dosage inadéquat du Rilotumumab.

L'Onartuzumab (MetMab) va quant à lui reconnaître le domaine SEMA de MET et empêcher sa liaison avec l'HGF/SF. L'Onartuzumab est un anticorps monovalent qui va prévenir la dimérisation du récepteur. Cette stratégie d'inhibition a été principalement étudiée dans les cancers pulmonaires, gastriques, colorectaux et dans les glioblastomes. Bien que les résultats d'études de phase II étaient prometteurs, avec une augmentation significative du taux de réponse globale chez des patients atteints d'un cancer pulmonaire recevant en combinaison l'Onartuzumab avec l'Erlotinib (inhibiteur de l'EGFR), comparé à l'Erlotinib seul ces résultats n'ont pas été confirmés en phase III (Spigel et al., 2011, 2017). De la même manière, une deuxième étude de phase III chez des patients atteints de cancer gastrique, a montré que l'ajout d'Onartuzumab à une chimiothérapie standard n'apportait aucun bénéfice (Shah et al., 2015). Toutefois, dans ces deux essais le seul critère d'inclusion était, là encore, la surexpression de MET par IHC.

Dans l'ensemble, malgré des résultats d'études cliniques de phase II prometteurs, des études sur de plus grandes cohortes n'ont pas permis de les confirmer. Cependant, ces études ont été réalisées avec comme critère de sélection une détection de la surexpression de MET par IHC. Or, nous avons vu que dans la majorité des cas elle ne conduit pas à une dépendance au récepteur. Un autre point important est que la surexpression de MET va plutôt conduire à une activation du récepteur indépendante du ligand. Dans ce cas, l'utilisation d'un TKI devrait se révéler plus bénéfique. L'utilisation d'un anticorps bloquant l'interaction ligand-récepteur pourrait s'avérer plus efficace dans des cas de cancers avec surexpression du ligand (Comoglio et al., 2018).

En conclusion, nous avons vu que le traitement par TKI donne de très bons résultats chez des patients atteints d'un cancer du poumon avec une amplification ou des translocations de MET. A l'inverse les anticorps bloquants n'apportent aucun bénéfice chez des patients présentant une surexpression de MET dans divers types de cancers. Ces différences de réponses semblent pouvoir s'expliquer par la sélection des patients qui apparait cruciale pour favoriser la réussite d'un traitement.

C.3. Les molécules antagonistes de MET ou de l'HGF

D'autres stratégies se développent afin de bloquer l'interaction ligand-récepteur par le biais de molécules compétitrices composées des sous domaines de MET ou de l'HGF/SF. Par exemple, il existe aujourd'hui des antagonistes, inspirés du variant naturel NK2 de l'HGF/SF (composé du domaine N et du domaine kringle 1 et 2), capable de lier MET sans induire son activation comme le variant NK4. Il a été démontré que le variant NK4 (composé du domaine N et du domaine kringle 1 à 4) est capable de limiter la formation de métastases dans des modèles murins et est associé à une baisse de la phosphorylation de MET. De plus, NK4 possède une activité anti-angiogénique indépendante de la signalisation de MET mais dont les mécanismes sont encore inconnus (Kuba et al., 2000; Tomioka et al., 2001; Wen et al., 2004). De la même manière, des molécules dérivées de sous-domaines de MET ont été développées afin de créer des leurres pour l'HGF/SF. Celles-ci vont être composées de la totalité du domaine extracellulaire ou uniquement du domaine SEMA et leur utilisation est corrélée, de manière dose dépendante, à une baisse de l'activité du récepteur MET *in vitro* ainsi que de la prolifération et la survie des cellules. De la même façon, ces antagonistes vont inhiber la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffe (Coxon et al., 2009; Kong-Beltran et al., 2004; Tiran et al., 2008). Ces différentes molécules antagonistes de MET ou de son ligand sont donc des outils thérapeutiques potentiels. Toutefois, leur instabilité *in vivo* et leur biodisponibilité ne permettent pas, pour l'instant, leur utilisation en clinique.

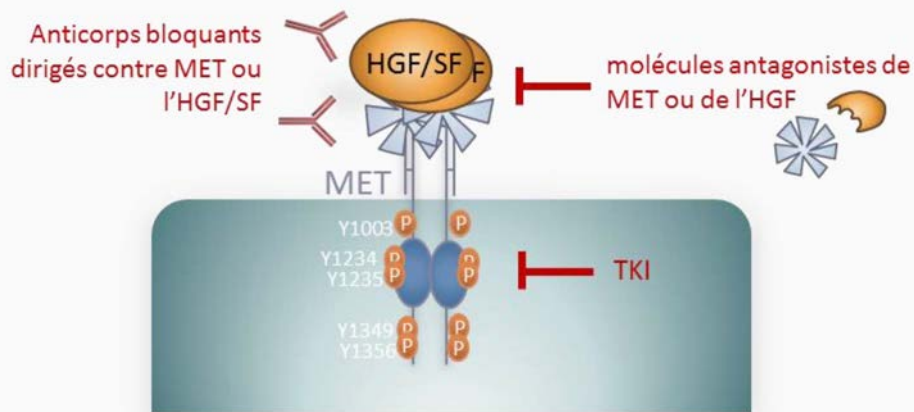


Figure 15 : Représentation schématique des stratégies d'inhibition de MET. Les stratégies d'inhibition visent soit à empêcher l'interaction de MET avec son ligand, soit à inhiber l'activité tyrosine kinase. Les inhibiteurs de l'interaction peuvent être soit des anticorps bloquants spécifiquement dirigés contre la région extracellulaire de MET ou l'HGF/SF soit des molécules antagonistes capable de lier MET sans l'activer ou encore des leurres capables de neutraliser l'HGF/SF. Les inhibiteurs de l'activité kinase sont principalement des mimétiques de l'ATP qui vont occuper la poche ATP et empêcher l'activation du récepteur.

C.4. Vers l'addiction au récepteur MET

L'efficacité des thérapies ciblées chez les patients démontrent que la survie et la croissance des cellules cancéreuses peuvent dépendre d'un seul oncogène. Cette dépendance a été qualifiée « d'addiction à un oncogène » (Weinstein and Joe, 2008). Ces oncogènes sont le plus souvent des acteurs de la signalisation tels que les RTKs ou les protéines KRAS et PI3K. Par exemple, les mutations activatrices de la kinase qui touchent le récepteur EGFR sont associées à une efficacité des TKI dans les CBNPC, ce qui montre que le récepteur est responsable de l'addiction oncogénique (Rosell et al., 2012).

Le récepteur MET est considéré comme une cible prometteuse dans le cancer, avec plus de 300 essais cliniques en cours évaluant l'efficacité des inhibiteurs contre le récepteur ou son ligand (Furlan et al., 2014). Dernièrement, plusieurs essais cliniques évaluant l'action des inhibiteurs de MET ont donné des résultats assez décevants. Toutefois, nous savons aujourd'hui que la surexpression de MET n'est pas forcément associée à l'activation du récepteur (partie B.2). On peut alors supposer que l'échec de ces essais cliniques soit dû à la non-discrimination des patients atteints d'une réelle addiction à MET. Plusieurs études soulignent que l'inhibition du récepteur MET peut être efficace dans certains sous-groupes de patients présentant une forte activation de MET et présentant probablement une addiction au récepteur (Camidge et al., 2014; Davies et al., 2017; Ou et al., 2011). Nous avons alors souhaité référencer dans une revue les différents mécanismes d'addiction au récepteur MET ainsi que leurs conséquences sur le diagnostic et les stratégies thérapeutiques. A ce jour, 4 types d'altérations

moléculaires conduisent à une dépendance à l'oncogène MET : les mutations, l'amplification génique, la surexpression d'HGF/SF et les réarrangements chromosomiques. Bien que dans chaque type de cancer, la dépendance au récepteur MET n'affecte qu'un nombre restreint de patients (1-5%), la mutualisation des résultats permet de dégager une population susceptible de bénéficier de thérapies ciblant l'addiction à MET.

Publication n°1 : The multiple paths towards MET receptor addiction in cancer

Leslie Duplaquet, Zoulika Kherrouche, Simon Baldacci, Philippe Jamme, Alexis B. Cortot, Marie-Christine Copin, David Tulasne

The multiple paths towards MET receptor addiction in cancer

Leslie Duplaquet¹, Zoulika Kherrouche¹, Simon Baldacci¹, Philippe Jamme¹, Alexis B. Cortot^{1,3}, Marie-Christine Copin^{1,2} and David Tulasne¹

¹ Univ. Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161 - M3T - Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, F-59000 Lille, France

² Univ. Lille, Institut de Pathologie, Avenue Oscar Lambret, CHU Lille, F-59000 Lille, France.

³ Univ. Lille, CHU Lille, Thoracic Oncology Department, F-59000 Lille, France

Keywords: Oncogene addiction, MET, Receptor tyrosine kinase, Hepatocyte growth factor/scatter factor, Targeted-therapies

Running title: MET addiction

Corresponding Authors: David Tulasne, Univ. Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161 - M3T - Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, F-59000 Lille

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the CNRS, the Institut Pasteur de Lille, and INSERM, and by grants from the "Ligue contre le Cancer, comité Nord", the "Association pour la Recherche sur le Cancer", the "Institut National du Cancer", the "Cancéropôle Nord-Ouest" and the "Site de Recherche Intégrée sur le Cancer, SIRIC ONCOLille".

Abstract

Targeted therapies against receptor tyrosine kinases (RTKs) are currently used with success on a small proportion of patients displaying clear oncogene activation. Lung cancers with a mutated EGFR provide a good illustration. The efficacy of targeted treatments relies on oncogene addiction, a situation in which the growth or survival of the cancer cells depends on a single deregulated oncogene. MET, a member of the RTK family, is a promising target because it displays many deregulations in a broad panel of cancers. Although clinical trials having evaluated MET inhibitors in large populations have yielded disappointing results, many recent case reports suggest that MET inhibition may be effective in a subset of patients with unambiguous MET activation and thus, most probably, oncogene addiction. Interestingly, preclinical studies have revealed a particularity of MET addiction: it can arise through several mechanisms, and the mechanism involved can differ according to the cancer type. The present review describes the different mechanisms of MET addiction and their consequences for diagnosis and therapeutic strategies. Although in each cancer type MET addiction affects a restricted number of patients, pooling of these patients across all cancer types yields a targetable population liable to benefit from addiction-targeting therapies.

Introduction

Notion of oncogene addiction

Over the last decades, detection and characterization of genetic alterations in cancers, supported mainly by improved genome sequencing, has led to the discovery of activated oncogenes directly associated with tumorigenesis, notably genes encoding actors of signaling pathways, such as receptor tyrosine kinases (RTKs), and signaling hubs such as KRAS and PI3K. RTK activation results from various genomic alterations, including point mutations, chromosomal translocations, and gene amplifications. All these alterations can lead to ligand-independent RTK activation. In parallel with the discovery of RTK activation in cancers, numerous inhibitors of this receptor family have been developed, including small drugs inhibiting one or several kinase activities (tyrosine kinase inhibitors, TKIs) and monoclonal antibodies which hinder receptor-ligand interaction by targeting the receptor or its ligand.

While tumor cells accumulate many (an estimated 30 to 60) genetic alterations¹, experimental evidence (obtained with cancer cell lines) and the efficacy of targeted therapies in patients demonstrate that the growth and survival of some cancer cells depend on a single deregulated oncogene. This dependence on a driver oncogene has been coined “oncogene addiction”². An illustrative example is activation of the BCR-ABL gene in chronic myelogenous leukemia: targeted therapies directed against the ABL kinase have led to strong clinical responses³. RTK-activating anomalies are also responsible for oncogene addiction in various cancers. Examples include EGFR mutations in non-small-cell lung cancers (NSCLC), associated with the efficacy of EGFR-targeting TKI treatment⁴, and *ERBB2* gene amplification in breast cancers, associated with the efficacy of therapeutic antibodies against ERBB2⁵. Although therapies targeting oncogenes to which a tumor is addicted improve overall patient survival, resistances inevitably appear, leading to therapeutic failure and tumor relapse.

The MET receptor

The receptor tyrosine kinase MET is deregulated in many kinds of tumors and might thus be a promising target for anticancer therapy. For instance, about half of all patients with NSCLC overexpress MET, and this overexpression is associated with poor prognosis⁶⁻⁸. This has prompted several clinical trials aiming to evaluate the efficacy of MET-targeting therapies in MET-overexpressing patients. Disappointingly, a phase III clinical trial evaluating the efficacy of an anti-MET antibody associated with an EGFR TKI in NSCLC patients failed to demonstrate any benefit for patients⁹. Another phase III trial in NSCLC patients, evaluating treatment with a MET TKI combined or not with an EGFR TKI, likewise showed no efficacy in the overall population, and only a trend toward improved overall survival and progression-free survival in the subgroup of patients with MET-

positive tumors¹⁰. With hindsight, it was pointed out that MET overexpression does not necessarily reflect MET receptor activation and thus MET addiction.

Despite the disappointing results of these flagship phase III clinical trials, there exist preclinical data, case reports, and clinical trial data demonstrating the efficacy of MET targeting in cases of *MET* oncogene addiction. Interestingly, and in contrast to other oncogene addictions, MET dependence involves multiple alterations. Although MET addiction appears to occur in a low proportion of patients, it has been described in many different cancer types (Figure 1).

MET is an RTK produced predominantly in cells of epithelial origin. It is activated by its stromal ligand, the hepatocyte growth factor (HGF), also called scatter factor¹¹. *HGF* and *MET* are essential to embryonic development, since knockout of either one affects epithelial organ, placenta, muscle, and neuron formation¹²⁻¹⁵. Conditional knockout of *MET* in the lung has demonstrated its involvement in alveolar development¹⁶. In adults, the HGF-MET pair is involved in physiological processes such as epidermal healing and liver regeneration¹⁷⁻¹⁹.

The extracellular part of MET contains an N-terminal SEMA domain encompassing the α subunit and the first amino acids of the β subunit, followed by a plexin-semaphorin-integrin (PSI) domain and four immunoglobulin-like domains. The intracellular region contains a juxtamembrane domain, the tyrosine kinase domain, and a C-terminal tail²⁰. MET interaction with its ligand favors the dimerization of MET and its autophosphorylation on two tyrosine residues of the catalytic domain (Y1234 and Y1235). Other tyrosine residues, located outside the kinase domain, are then phosphorylated, especially tyrosine 1003 in the juxtamembrane domain and tyrosines 1349 and 1356 in the C-terminal tail^{21, 22}. The phosphorylated C-terminal residues allow recruitment of important effectors such as GAB1 (GRB2-associated binder-1) and PI3K (phosphoinositide 3 kinase). This multi-substrate docking site plays a key role in MET-induced biological responses, since its mutation in mice causes phenotypes similar to those of MET-deficient mice²³.

Downregulation of MET receptor activity is also an essential process, as it prevents receptor oversignaling. All the negative regulatory mechanisms evidenced so far target the juxtamembrane region of the cytoplasmic part of the receptor, encoded by exon 14.

Addiction caused by MET mutations

Mutations in the kinase domain in papillary renal carcinomas

Germline and somatic MET mutations were initially found in 1997, in hereditary and sporadic papillary renal cell carcinomas (PRCC)²⁴. In the hereditary forms, germline MET mutations segregate with the disease, and this demonstrates a causal link between MET alteration and tumorigenesis²⁵. All these point amino acid substitutions lie within the kinase domain. They include V1110I, H1112Y/R, F1218I, D1246H/V, Y1248H, S1254R and M1268T (Figure 2). In sporadic PRCC, MET mutations

can affect up to 15% of patients²⁶. Activating MET mutations have also been evidenced in childhood hepatocellular carcinomas (M1268I)²⁷ and advanced head and neck cancers (Y1253D)^{28, 29} (Table 1).

When expressed in cell lines, these mutated MET receptors generally appear to be constitutively activated, as they display tyrosine phosphorylation and induce fibroblast transformation³⁰. It seems, however, that HGF stimulation can enhance their transformation-inducing capacity or, in some cases, even be required for mutated-MET-induced cell transformation³¹. In addition to promoting kinase activation, some of these mutations (M1268T and D1246N) favor MET recycling to the membrane³², which could favor receptor activation. The involvement of these mutants in tumorigenesis has been confirmed in knock-in mice expressing them, as such mice display various types of tumors (carcinomas, sarcomas, and lymphomas)³³. They also display duplication of the mutated *MET* allele, as observed in patients with hereditary PRCC³⁴.

Although it is well established that mutations in the MET kinase induce tumorigenesis, it has not been strictly demonstrated that they cause MET addiction, for lack of cell lines derived from patients displaying such mutations. A phase II clinical trial has been conducted, however, to evaluate the efficacy of foretinib, a multitarget TKI notably inhibiting MET and VEGFR, in patients with PRCC, with or without germline MET mutations. In this study, the rate of response to MET TKI (about 50%) was higher in patients harboring germline MET mutations. This clinical trial suggests that germline MET mutations in PRCC are predictive of a response to a MET inhibitor³⁵. Other clinical trials are currently recruiting participants to evaluate the efficacy and safety of MET TKIs in PRCC patients. Examples include a phase II trial for Savolitinib and one for INC280 (clinical trials NCT02127710 and NCT02019693, respectively).

MET exon 14 mutations in lung cancer

Besides mutations in the MET kinase domain leading, as expected, to tyrosine kinase activation, mutations have recently been found in MET exon 14, encoding the juxtamembrane domain. Various alterations, including point mutations, deletions, insertions, and complex mutations, all affecting splice donor or acceptor sites of exon 14, have been reported in lung cancer patients (Table 1). The exon 14 mutation rate seems particularly high in adenocarcinomas (2.6 to 3.2%)³⁶⁻³⁸ and pulmonary sarcomatoid tumors (2.6 to 31.8%)^{36, 38, 39}. Exon 14 splice mutations have also been observed in other tumor types, including gastric cancers (7.1%), colorectal cancers (0 to 9.3%), brain gliomas (0.4%), and more rarely other malignancies^{37, 40} (Table 1). All these alterations potentially lead to exon 14 skipping and hence to deletion of 47 AA constituting a large part of the juxtamembrane domain.

The juxtamembrane region concentrates most of the sites involved in negative MET regulation, including (i) serine 985, whose ligand-dependent phosphorylation is involved in downregulation of the tyrosine kinase activity⁴¹⁻⁴³, (ii) Y1003, whose ligand-dependent phosphorylation is involved in recruitment of the E3 ubiquitin ligase CBL and subsequent degradation of MET⁴⁴, and (iii) the ESVD1002 caspase site involved in caspase cleavage of MET during apoptosis⁴⁵. Mutation of

Tyr1003 confers transforming properties⁴⁶, but the relative contributions of the other sites to the transforming phenotype observed in exon-14-deleted MET cancer cells have not been studied so far.

The cell lines NCI-H596, derived from an NSCLC, and Hs746T, derived from a gastric carcinoma, display MET exon 14 skipping^{47, 48}. Other genetic alterations have also been identified in these two cell lines: Hs746T cells display amplification of the *MET* gene and H596 cells have an activating mutation in PI3KCA⁴⁹. *In vitro*, treatment of Hs746T cells with the MET TKI crizotinib (a multi-target TKI of MET, ALK, and ROS1) inhibits PI3K and MAPK signaling and blocks cell proliferation. Since this cell line displays both *MET* gene amplification and exon 14 mutation, sensitivity to the MET inhibitor cannot be attributed with certainty to exon 14 skipping. In H596 cells, because of the association of MET exon 14 skipping and the PI3KCA mutation, combining crizotinib with a PI3K inhibitor is required to reach similar results⁵⁰. Interestingly, the CRISPR/Cas9 system has recently been used to create a MET exon 14 deletion by genome editing in HEK293 cell lines. These mutated cell lines display higher MET expression, enhanced MET phosphorylation, and prolonged activation of downstream signaling pathways, as expected to result from deletion of the corresponding negative regulatory sites. In addition, exon-14-deleted cell lines are more sensitive to crizotinib than the wild-type parental cells⁵¹.

To date, case reports have described the treatment of 16 lung cancer patients displaying MET exon 14 splice mutations with a MET-targeting or multitarget TKI (crizotinib, capmatinib, or cabozantinib^{36, 37, 50, 52-59}). Although interpretation of these data is restricted by the small number of patients and by selection bias, dramatic and prolonged responses have been reported, in line with the known efficacy of targeted therapies in other models of oncogene-addicted tumors. These encouraging preliminary results have prompted tremendous efforts to design and launch clinical trials evaluating various MET TKIs in the treatment of MET-mutant cancers.

Non-addictive MET mutations

Other MET mutations affecting the juxtamembrane domain, including the R970C, P991S, and T992I substitutions, have been described in 3 to 10% of lung cancers⁶⁰⁻⁶³ (Table 1). Studies have demonstrated that they favor the growth of experimental tumors, via a mechanism not involving direct kinase activation^{61, 64, 65}. For example, we have recently demonstrated that the R970C mutation favors MET proteolytic cleavages by calpain in lung cancer cells, leading to generation of an intracellular fragment of about 45 kDa which favors migration and invasion by HGF/SF-stimulated epithelial cells. These data support an original mechanism of MET activation, involving generation of an active fragment⁶⁶. Yet consistently with the absence of direct activation of the MET kinase, cell addiction to these mutations was not observed.

Addiction caused by an HGF/SF autocrine loop

As described above, MET mutations can induce ligand-independent activation of the receptor. MET addiction can also depend, however, on constitutive activation by HGF binding. It has notably been shown that MET and HGF can be co-expressed in the more aggressive types of human gliomas, and several studies have shown higher HGF expression in high-grade than in low-grade gliomas⁶⁷⁻⁶⁹. Consistently, MET expression has been found in all tested glioma cell lines, and some of them also express HGF^{67, 68}. These observations indicate that HGF expression is not due only to cells in the tumor environment but that glioma cells may exhibit an HGF-MET autocrine activation loop.

SCID mice having received intracranial xenografts of an HGF-expressing human glioblastoma cell line have been shown to develop larger tumors than mice xenografted with HGF-negative cells⁷⁰. Furthermore, use of a neutralizing anti-HGF antibody to inhibit endogenous HGF expression in glioma cell lines prevents cell malignancy, and treatment with a MET inhibitor increases apoptosis of glioma cell lines expressing HGF^{67, 71}. Conversely, addition of exogenous HGF enhances the proliferation, motility, and invasiveness of glioma cells in a dose-dependent manner, even if they already display an HGF-MET autocrine loop. These results reveal MET addiction caused by an HGF autocrine loop as a mechanism involved in tumor development.

Interestingly, co-expression of HGF and MET seems predictive of sensitivity to MET inhibition. In glioblastoma xenograft models, treatment with a MET tyrosine kinase inhibitor has been shown to be more effective against high-HGF than against low-HGF tumors^{71, 72}. Besides MET inhibition by classical TKIs, several strategies have been developed to inhibit ligand activation of MET in glioblastoma cells. A first strategy was to use either the HGF antagonist NK4 (a subdomain of HGF consisting only of its α -subunit) or an anti-HGF or anti-MET neutralizing antibody to prevent HGF-MET binding. Both treatments were found to reduce tumor growth in mice xenografted intracranially with an HGF-expressing glioblastoma cell line⁷³⁻⁷⁶. A second strategy was to use a liposome-DNA complex or an adenovirus to inhibit MET or HGF expression with a U1snRNA/ribozyme. These genetic therapies specifically targeting HGF or MET were found to prevent growth of intracranial HGF-expressing glioblastoma xenografts and to promote animal survival. These treatments appeared to enhance apoptosis in tumors, as evidenced by detection of necrotic areas on histological sections and by an increase in activated caspase 3^{77, 78}.

To date, nine clinical trials targeting the HGF-MET pathway in gliomas have been registered. At first glance, the early results failed to demonstrate any clinical benefit⁷⁹⁻⁸¹, but further investigation of the patient cohort using HGF expression as a biomarker confirmed that the HGF content may be predictive of treatment efficacy, as patients with high-HGF tumors showed significantly longer median progression-free survival than patients with low-HGF tumors when treated with anti-MET neutralizing antibody (onartuzumab)⁸⁰. In order to improve treatment efficacy, more research is

needed to identify a subset of patients showing an HGF autocrine loop that might respond to HGF-MET inhibition.

Addiction caused by *MET* gene amplification

MET gene amplification was initially observed in spontaneously transformed NIH3T3 mouse fibroblasts transfected with DNA from neoplastic or non-neoplastic cells⁸². In this murine cell model, Southern blotting revealed a 4- to 8-fold amplification of the endogenous *MET* gene, leading to at least a 20-fold increase in *MET* mRNA. *MET* amplification was later detected in GTL16, a human gastric tumor cell line derived from a subclone of MKN45, displaying 10-fold amplification of the *MET* gene⁸³. In each case, amplification led to *MET* overexpression and constitutive kinase activation, independently of ligand stimulation (Figure 3A). Later, several amplified-*MET* cancer cell lines were characterized and used in preclinical studies of *MET* inhibition. These notably included cell lines derived from lung cancers (EBC-1, H1993)⁸⁴ or gastric cancers (MKN45, GTL-16, SNU5, KatoII)⁸⁵⁻⁸⁷. Alongside these cell lines displaying amplification of wild-type *MET*, the gastric cancer cell line Hs746T has an amplified mutated version of *MET* leading to exon 14 skipping⁴⁸. Addiction to *MET* caused by gene amplification has been clearly demonstrated in some of these cell lines, as it was possible to induce cell growth arrest and/or cell death either by treatment with a selective tyrosine kinase inhibitor such as PHA-665752 (gastric cancer cell lines⁸⁷) or by ShRNA-mediated *MET* knockdown (NSCLC cell lines⁸⁸).

So far, animal models of *MET* gene amplification are imperfect. On the one hand, mice overexpressing a *MET* transgene have been found to develop spontaneous tumors and metastasis⁸⁹⁻⁹¹. On the other hand, a genetically engineered mouse model of breast cancer, where BRCA1 and p53 were conditionally deleted in the mammary epithelium, was found to display *MET* gene amplification in 73% of cases, suggesting that *MET* gene amplification is a secondary alteration involved in tumorigenesis.⁹² No model, however, fully reproduces the situation created by *MET* amplification. For lack of adequate genetically engineered mouse models, *in vivo* testing of the efficacy of anti-*MET* therapies has been done mainly on cell-line xenograft models displaying *MET* amplification and on patient-derived xenograft (PDX) models. In one *in vivo* preclinical study, for instance, two PDX models of PRCC displayed tumor growth inhibition in response to AZD6094, a selective *MET* inhibitor⁹³.

In some cell lines, such as GTL-16 and EBC-1, *MET* gene amplification is indisputable, as the number of gene copies can exceed ten. In tumor samples, characterizing amplification is more challenging, as a wide range of situations can arise. *MET* copy-number gain is a continuous variable, but it reflects two distinct processes: polysomy and amplification. These can be distinguished by fluorescence in situ hybridization (FISH), on the basis of the *MET/CEP7* (chromosome 7 enumeration probe) ratio. The *MET/CEP7* ratio is preserved in polysomy, each copy of *MET* being associated with

a centromere, while in true *MET* amplification, the *MET/CEP7* ratio increases because only the *MET* gene copy number increases⁹⁴ (Figure 3B).

Despite the use of such tools, the determined level of *MET* amplification varies between studies⁹⁵⁻⁹⁸, and no consensus has been reached. In particular, the number of *MET* gene copies necessary to induce massive *MET* expression and subsequent ligand-independent activation is not defined and may vary according to the cell context^{87,99}.

Assuming that the *MET* gene is amplified if the *MET/CEP7* ratio determined by FISH exceeds 2, it has been found to occur in 3 to 5% of patients with NSCLC, gastric cancer, hepatocellular carcinoma, nasopharyngeal carcinoma or a glial tumor. In most cases, a good correlation was found between *MET* amplification and high level *MET* protein expression¹⁰⁰⁻¹⁰⁵. In metastatic colorectal carcinomas, *MET* amplification is rare (<2%) in both primary tumors and liver metastases¹⁰⁶. In sarcomas, true amplification has been observed only in a special type of sarcoma called undifferentiated pleomorphic sarcoma, and no correlation with protein expression was found¹⁰⁷. In PRCC, true amplification does not occur, since a high correlation is observed between *MET* copy number and the number of chromosome 7 centromeres, but the observed high incidence (~75%) of chromosome 7 trisomy or tetrasomy may account for genetic changes occurring in the early stages of tumor development¹⁰⁸.

Interestingly, *MET* gene amplification signals a bad prognosis. In gastric cancer, for instance, amplified-*MET* tumors display the worst overall survival¹⁰⁹⁻¹¹¹. In breast carcinomas, *MET* gene amplification (~8%) is associated with an increased risk of distant recurrence for patients receiving chemotherapy¹¹². In gliomas, *MET* gene amplification is associated with glioma aggressiveness, being found only in grade IV (and thus not in grades II and III)¹¹³.

In human disease, it has been proposed to use high *MET* gene amplification as an indicator of *MET*-amplification-linked addiction. In NSCLC, high *MET* gene amplification (*MET/CEP7* ≥ 5) is a rare event, occurring in only 0.34% of patients. In these patients no other oncogenic drivers have been described, in contrast to patients displaying low *MET* gene amplification (*MET/CEP7* ratio <5). This strengthens the idea that high *MET* gene amplification may act as a driver. Accordingly, an association has been observed between high *MET* gene amplification and a high rate of response to the *MET* TKI crizotinib. This suggests that a *MET/CEP7* ratio ≥ 5 is indicative of a true *MET*-addicted state¹¹⁴. In another study, transient sensitivity to crizotinib was likewise observed in two of four patients with gastroesophageal carcinoma displaying *MET* gene amplification¹¹⁵. It is noteworthy, however, that Zhang et al. report a rapid response to crizotinib in a lung adenocarcinoma patient whose tumor displayed a *MET* copy number gain but not a high *MET/CEP7* ratio¹¹⁶. Therefore, results of larger clinical trials are eagerly awaited in order to evaluate the predictive value of *MET* gene amplification for the use of targeted therapies.

In the recent French clinical trial “AcSé crizotinib”, 25 patients with *MET*+ NSCLC (> 6 *MET* copies, whatever the *MET/CEN7* ratio) were enrolled and received Crizotinib. Among the 18 patients

whose response could be evaluated after 8 weeks, 7 partial responses, 6 stable diseases, and 5 progressive diseases were observed (Moro-Sibilot D, abstract WLCL 2015). Several clinical trials are ongoing to assess the efficacy of MET TKI in advanced amplified-*MET* solid tumors¹¹⁰. Examples include a phase I trial for preliminary evaluation of the antitumor effect of the MET TKI SAR125844 and a phase II trial evaluating Crizotinib in amplified-*MET*-gene NSCLC patients (NCT02435121 and NCT02499614 clinical trials, respectively).

MET gene amplification as a resistance mechanism creating a new addiction

In lung and colorectal cancers, interestingly, MET amplification leading to constitutive activation of the receptor has also been described as a mechanism of resistance to an EGFR-targeting TKI in patients displaying EGFR-activating mutations^{117, 118}. This resistance mechanism has been found in 5 to 20% of patients with NSCLC. In resistant-cell-line models displaying *MET* gene amplification and in patients described in case reports, co-treatment with TKIs against EGFR and MET was found to overcome this resistance. This demonstrates the involvement of both RTKs^{117, 119-121}. Clinical trials are ongoing to establish whether co-treatment with EGFR and MET TKIs is therapeutically beneficial to patients whose tumors are resistant to EGFR inhibition. In sarcomatoid lung carcinomas, *ALK* gene amplification is associated with *MET* gene amplification in 16% of cases. Thus, *ALK* and *MET* co-amplification might constitute a mechanism of combined oncogene addiction¹²².

MET fusions: a novel route towards MET addiction

The MET receptor was discovered in 1984 in the human osteosarcoma cell line HOS treated with the carcinogen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. The treated cells displayed a chromosomal rearrangement leading to fusion of the *TPR* (*translocated promoter region*) gene to *MET* exon 15. The resulting chimeric protein TPR-MET contains the MET kinase domain but excludes the negative regulatory juxtamembrane domain^{123, 124} (Figure 4A and B). The TPR part of the fusion protein, including a dimerization leucine zipper motif, induces its constitutive dimerization and thus activation of the MET kinase domain, resulting in transforming activity. This fusion, extensively studied, displayed a strong potential to induce MET activation, cell transformation, and tumorigenesis in a mouse model¹²⁵. Yet as TPR-MET fusions were not found initially in human tumor samples, it was assumed until recently that MET fusions were not involved in human tumorigenesis¹²⁶.

Since 2014, thanks to high-throughput RNA sequencing, various MET fusions have been described in several cancer types. The first MET fusions were described in glioblastomas, where RNA sequencing revealed among 272 patients four rearrangements involving the receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta gene (*PTPRZ1*) and the *MET* gene (about 1.3%)¹²⁷. These PTPRZ1-MET fusions were found to preserve the entire MET receptor sequence, but led to increased MET expression and phosphorylation¹²⁸ (Figure 4A). In pediatric glioblastomas, two additional fusions were

found, involving the *CLIP2* gene and the *TRK*-fused gene (*TFG*), previously described to form chimeric proteins with NTRK1. For both CLIP2-MET and TFG-MET, the fusion involved the *MET* exon 15. These two chimeric proteins thus resemble the TPR-MET fusion at the origin of MET discovery, since they contain the MET kinase domain and exclude the juxtamembrane regulatory domain (Figure 4B). Importantly, the growth of high-grade gliomas created in mouse models with cell lines expressing the TFG-MET chimera has been found to be inhibited by MET TKI. In addition, treatment with the MET TKI crizotinib of a pediatric patient bearing a MET-fusion-expressing glioblastoma led to tumor shrinkage, before resistant lesions appeared¹²⁹. In melanoma, various other in-frame fusions have been identified, while present in low frequency (less than 1%). Like the TPR-MET prototype, all of these fusions consist of MET lacking the regulatory juxtamembrane domain, with various N-terminal partners (TRIM4, ZKSCAN1, PPFIBP1, LRRFIP1, EPS15, DCTN1) (Figure 4B). As expected, these chimeric proteins are constitutively phosphorylated and induce tumor formation in xenograft animal models¹³⁰. Lastly, a case report describes a patient with a chemoresistant lung cancer displaying an in-frame HLA-DRB1-MET fusion. Like the fusions described above, this chimeric MET contains the kinase domain without the juxtamembrane regulatory sequence (Figure 4B). Treatment of this patient with crizotinib led to a drastic response over 8 months¹³¹. All in all, various MET fusions leading to ligand-independent MET kinase activation have been described in at least three types of cancer, and two case reports describe a response to MET TKI in patients exhibiting MET fusions. These findings suggest that such fusions can create a targetable oncogene addiction.

Resistance to MET inhibitors

As patients treated with TKI against EGFR, in whose resistance are systematically observed¹³², several case reports describing resistance to MET inhibitors in tumors harboring MET addiction were recently published¹³³⁻¹³⁷. Because the patients treated to date with MET TKIs mainly displayed *MET* gene amplification or MET exon 14 mutations, these are the situations in which resistance mechanisms have been described, but this does not preclude the existence of resistance in patients with MET addiction due to other causes. Many acquired mechanisms of resistance to MET TKI treatment have been described in both patients and MET-addicted cells.

The first molecular modifications observed are mutations in the MET receptor itself. Most of the described mutations, such as mutations of D1246 or Y1248, are located in the kinase domain and lead to its constitutive activation. These mutations were first described in cell models displaying *MET* gene amplification (such as MKN45 cells) and exposed to MET inhibitors¹³⁸⁻¹⁴⁰. Later, similar mutations were observed in NSCLC patients displaying either MET exon 14 skipping or *MET* gene amplification and treated with the MET inhibitor crizotinib or INC280¹³³⁻¹³⁷. It is worth noting that these mutations were already known to promote MET activation in familial and sporadic PRCC²⁴. Interestingly, mutations of D1246 or Y1248 create resistance to type I TKIs such as crizotinib and

INC280, which bind to the active form of MET. In contrast, type II TKIs such as cabozantinib, which bind to the inactive form of MET, can inhibit these mutated receptors and thus offer alternative therapies for resistant patients¹³⁷.

Resistance to MET inhibition can also be mediated by activation of another RTK, such as EGFR. In cell models displaying *MET* gene amplification, resistance to a MET TKI can involve activation of EGFR¹⁴¹. In one patient, observations confirmed that this resistance was supported by a MET-to-EGFR oncogene switch, since the patient, whose tumor harbored a mutation causing exon 14 skipping, displayed an initial response to crizotinib, followed by a relapse associated with the EGFR-activating mutation L861A¹⁴². Also interesting is the well-known fact that in NSCLC tumors with EGFR-activating mutations, resistance to EGFR TKIs involves *MET* gene amplification. It thus appears that each receptor can be the resistance factor of the other.

Many other mechanisms, described in cellular models, are involved in resistance to MET inhibitors. They include KRAS mutation or amplification, BRAF fusion, and overexpression of genes encoding kinases belonging to MET downstream signaling pathways (PI3K, PIM kinase 1, PIM kinase 3) or of other oncogenes, such as the gene coding for the c-MYC transcription factor.¹³²⁻¹³⁸ To date, these alterations have not been described in patients showing resistance to MET TKI, but they are often suspected.

From expedience to transient addiction

MET is overexpressed in many cancers. In NSCLC, for instance, half of all tumors overexpress this receptor¹⁴³. Yet in the vast majority of cases, overexpression does not lead to oncogene addiction, as evidenced by the following facts: (1) many cell lines overexpressing MET do not display MET activation and are not sensitive to MET TKI; (2) many MET-overexpressing tumors do not display MET phosphorylation; (3) as already mentioned, several clinical trials evaluating MET inhibitors have demonstrated no efficacy when patients were selected on the sole basis of MET expression^{9, 10}. Although MET overexpression is clearly not synonymous with oncogene addiction, several arguments suggest that even in the absence of addiction, MET can play active roles in tumorigenesis. In many types of cancer, MET overexpression thus appears associated with bad prognosis, although the role of MET in the pathological process remains elusive.

Oncogene addiction occurs when an oncogene is required to maintain a cell lineage alive, mainly by maintaining cell proliferation and/or survival. Yet oncogenes can regulate many cellular processes not required for cell maintenance in established tumors but possibly involved in particular pathogenesis-related events. In line with this view, the MET receptor is well known to regulate cell motility and invasion within a reconstituted extracellular matrix¹¹, and this competence is crucial to promoting invasion at the tumor front or metastasis. Interestingly, MET expression has been found to be higher at the front of NSCLC tumors than at their core¹⁴⁴. Furthermore, Benedettini *et al.* report increased MET expression and a *MET* copy number gain in cerebral metastases as compared to

primary tumors¹⁴⁵. Another study performed on surgically resected NSCLC patients has shown increased MET expression and *MET* gene copy number to be more frequent in lymph node metastasis than in primary tumors¹⁴⁶. In the same line, MET activation can promote the survival of cells cultured without anchorage¹⁴⁷. This competence is liable to favor cell survival during metastatic dissemination.

The potential involvement of MET at particular points in tumor history, restricted in space and/or time, has led Paolo Comoglio to propose the notion of “oncogene expedience”, according to which the oncogene is activated only in some crucial situations. In the context of oncogene expedience, MET might be activated during a crucial time window corresponding to its transient overexpression or its activation by HGF. In some tumors, for instance, MET might be activated specifically during metastatic dissemination, while most of the time it would not be required for tumor growth. If the oncogene is indeed crucial in a restricted space and timeframe, expedience could reflect a “transient addiction” offering a potential window for targeting its deleterious activity.

Future challenges

To date, four types of anomaly involving MET receptor deregulation and leading to MET oncogene addiction have been described: (i) MET mutations (ii) the HGF autocrine loop, (iii) *MET* gene amplifications, and (iv) MET fusions. All these alterations have been found to occur in a low proportion of cases (1 to 5%), but they have been found in several cancers, including ones affecting large numbers of people. Hence, all MET alterations combined, MET-addicted tumors represent a substantial number of patients liable to benefit from targeted therapies. The existence of multiple addiction mechanisms in the case of MET seems original, since only a few addiction mechanisms have been characterized in the case of other RTKs (for instance, EGFR mutations and ALK translocation in lung cancers, *ERBB2* gene amplification in breast cancers).

Although the four MET additions rely on different MET alterations, all of them lead to constitutive activation of the receptor, characterized by activation of its kinase domain. They do not all necessarily lead, however, to activation of the same downstream signaling pathways. The most illustrative example concerns *MET* gene amplification as compared to ligand stimulation (as in HGF autocrine glioblastoma). Unlike HGF stimulation, *MET* gene amplification leads to activation of several other RTKs such as ERBB3, acting as relays to activate downstream signaling pathways¹¹⁷. Massive MET expression at the membrane due to *MET* gene amplification thus appears to cause aberrant cross activation of other RTKs. Whether this favors the addiction process is unclear.

Although the four described mechanisms of MET addiction are mainly found independently, combinations of them can be observed in some patients. For example, some patients display both a MET exon 14 mutation and amplification of the mutated allele¹⁴⁸, and activating mutations within the kinase domain can be accompanied by duplication of the gene^{33, 34}. In both cases, the higher copy number of the mutated allele might favor its expression and constitutive activation. This mechanism could be particularly important in the case of MET exon 14 mutations resulting in deletion of the

juxtamembrane domain with its negative regulatory sites but unable to actually activate the receptor¹⁴⁹. Similarly, the continuous presence of HGF might favor activation of exon-14-mutated MET, although HGF expression has not been extensively studied in such patients.

An important challenge is to identify the low proportion of patients with a wide variety of cancers whose tumors have addiction-causing MET alterations. This is particularly important in the context of clinical trials aiming to test targeted therapies liable to benefit these patients specifically. For somatic mutations, next-generation sequencing (NGS) allows characterizing in a single sequencing run the mutational status of virtually all the genes in several tumor samples. Low-cost “targeted NGS” is currently used clinically to detect hundreds of alterations of known oncogenes and tumor suppressors. It is noteworthy, however, that MET exon 14 mutations are poorly covered by current commercially available targeted NGS panels. This highlights the need for rapid adaptation of these panels.

In contrast to characterization of mutations, evaluation of *MET* gene amplification and measurement of HGF expression are still time-consuming and costly and require many tumor samples, as they are mainly done on tumor sections, by FISH and IHC, respectively. Although these technical approaches are reliable, their suitability is questionable in the context of MET alterations to be found sometimes in only 1% of patients. Nevertheless, multiplexed technologies such as comparative genomic hybridization (CGH) arrays, allowing genome-wide detection of DNA gain or loss at approximately 10-kb resolution, are now suitable for routine clinical use. CGH arrays may allow characterization of all gene copy number modifications in a single hybridization. Similarly, multiplexed analysis of multiple gene fusion events is now possible with nanostring technology, provided the fusions to be detected are known.

So far, large phase 2 or 3 clinical trials have failed to demonstrate a clear anticancer efficacy of MET inhibitors. This contrasts with the multiple case reports demonstrating their efficacy against tumor cells displaying manifest MET addiction. It seems reasonable to propose that this failure of large clinical trials is due to inadequate patient recruitment linked to non-discrimination of patients with real MET addiction. As proper stratification is highly dependent on adequate molecular diagnosis, the use of novel high-throughput multiplexed technologies is likely soon to allow characterization of MET-addictive alterations in larger cohorts suitable for phase 2 or 3 clinical trials. Furthermore, the recent emergence of trials with an “umbrella” or “basket” design improves the evaluation of targeted therapies dedicated to small subsets of patients, such as those harboring MET-addictive alterations. Umbrella trials take patients with the same type of cancer and assign them to different arms of a study on the basis of their mutations. Basket trials group patients by mutation, regardless of which organ is involved. For instance, the French basket trial “AcSé crizotinib” allowed evaluation of crizotinib in patients suffering from either lung or gastric cancer with *MET* gene amplification (Moro-Sibilot D, abstract WLCL 2015).

Another important challenge is the quasi-systematic occurrence of resistance observed after TKI treatment in patients with MET-addicted tumors and in patients with solid tumors displaying other oncogene addictions. Major efforts are being made to anticipate these resistances in cell models and to identify them in patient samples as discussed above. Although possible resistance mechanisms are numerous, some of them are druggable. For instance, resistance to MET TKI in cells harboring a *MET* gene amplification or mutation can involve activation of EGFR, which can be targeted by an EGFR TKI^{141, 142}. Co-treatment with MET and EGFR TKIs might thus be used to circumvent resistance. In a recent study on animal models, co-treatment of amplified-*MET* tumors with MET and EGFR TKIs was found to inhibit tumor growth more effectively than MET TKI treatment alone, even if EGFR was not overexpressed. Moreover, co-treatment prevented the appearance of resistance through EGFR amplification¹⁵⁰. These data raise the question of treatment sequencing: they suggest the possibility of delivering the co-treatment before resistance appears, in order to prevent its appearance.

In conclusion, using MET inhibitors (developed by many companies) to treat patients with MET-addicted cancers is a novel therapeutic approach with documented benefits in several cases. To validate the use of such therapies in clinical practice, it is necessary to demonstrate in larger clinical trials the impressive responses recorded in a few case reports. This could be achieved through constructive collaboration between academia, hospitals, and companies, making it possible to exploit powerful high-throughput technologies and knowledge about MET addiction in order to select eligible patients and to develop effective targeted therapies.

References:

- 1 Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; 339: 1546-1558.
- 2 Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* 2002; 297: 63-64.
- 3 O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F *et al.* Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 2003; 348: 994-1004.
- 4 Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E *et al.* Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13: 239-246.
- 5 Baselga J, Carbonell X, Castaneda-Soto NJ, Clemens M, Green M, Harvey V *et al.* Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2162-2171.
- 6 Olivero M, Rizzo M, Madeddu R, Casadio C, Pennacchietti S, Nicotra MR *et al.* Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 1996; 74: 1862-1868.
- 7 Ichimura E, Maeshima A, Nakajima T, Nakamura T. Expression of c-met/HGF receptor in human non-small cell lung carcinomas in vitro and in vivo and its prognostic significance. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 1063-1069.
- 8 Park S, Choi YL, Sung CO, An J, Seo J, Ahn MJ *et al.* High MET copy number and MET overexpression: poor outcome in non-small cell lung cancer patients. *Histol Histopathol* 2012; 27: 197-207.
- 9 Spigel DR, Edelman MJ, O'Byrne K, Paz-Ares L, Mocci S, Phan S *et al.* Results From the Phase III Randomized Trial of Onartuzumab Plus Erlotinib Versus Erlotinib in Previously Treated Stage IIIB or IV Non-Small-Cell Lung Cancer: METLung. *J Clin Oncol* 2017; 35: 412-420.
- 10 Scagliotti G, von Pawel J, Novello S, Ramlau R, Favaretto A, Barlesi F *et al.* Phase III Multinational, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Tivantinib (ARQ 197) Plus Erlotinib Versus Erlotinib Alone in Previously Treated Patients With Locally Advanced or Metastatic Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33: 2667-2674.
- 11 Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 915-925.
- 12 Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 1995; 376: 768-771.
- 13 Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M *et al.* Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995; 373: 699-702.
- 14 Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shlota K, Kuno J, Noda T *et al.* Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 1995; 373: 702-705.
- 15 Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, Davies AM, Klein R. Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes Dev* 1997; 11: 3341-3350.
- 16 Calvi C, Podowski M, Lopez-Mercado A, Metzger S, Misono K, Malinina A *et al.* Hepatocyte growth factor, a determinant of airspace homeostasis in the murine lung. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003228.
- 17 Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, Stradal T, Munz B, Werner S *et al.* c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol* 2007; 177: 151-162.
- 18 Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 10608-10613.

- 19 Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 4477-4482.
- 20 Schiering N, Knapp S, Marconi M, Flocco MM, Cui J, Perego R *et al.* Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the hepatocyte growth factor receptor c-Met and its complex with the microbial alkaloid K-252a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 12654-12659.
- 21 Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L, Comoglio PM. Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene* 1994; 9: 49-57.
- 22 Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S *et al.* A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 1994; 77: 261-271.
- 23 Maina F, Casagrande F, Audero E, Simeone A, Comoglio PM, Klein R *et al.* Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* 1996; 87: 531-542.
- 24 Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P *et al.* Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 1997; 16: 68-73.
- 25 Schmidt L, Junker K, Weirich G, Glenn G, Choyke P, Lubensky I *et al.* Two North American families with hereditary papillary renal carcinoma and identical novel mutations in the MET proto-oncogene. *Cancer Res* 1998; 58: 1719-1722.
- 26 Durinck S, Stawiski EW, Pavia-Jimenez A, Modrusan Z, Kapur P, Jaiswal BS *et al.* Spectrum of diverse genomic alterations define non-clear cell renal carcinoma subtypes. *Nat Genet* 2015; 47: 13-21.
- 27 Park WS, Dong SM, Kim SY, Na EY, Shin MS, Pi JH *et al.* Somatic mutations in the kinase domain of the Met/hepatocyte growth factor receptor gene in childhood hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1999; 59: 307-310.
- 28 Aebersold DM, Landt O, Berthou S, Gruber G, Beer KT, Greiner RH *et al.* Prevalence and clinical impact of Met Y1253D-activating point mutation in radiotherapy-treated squamous cell cancer of the oropharynx. *Oncogene* 2003; 22: 8519-8523.
- 29 Ghadjar P, Blank-Liss W, Simcock M, Hegyi I, Beer KT, Moch H *et al.* MET Y1253D-activating point mutation and development of distant metastasis in advanced head and neck cancers. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26: 809-815.
- 30 Jeffers M, Schmidt L, Nakaigawa N, Webb CP, Weirich G, Kishida T *et al.* Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 11445-11450.
- 31 Michieli P, Basilico C, Pennacchietti S, Maffe A, Tamagnone L, Giordano S *et al.* Mutant Met-mediated transformation is ligand-dependent and can be inhibited by HGF antagonists. *Oncogene* 1999; 18: 5221-5231.
- 32 Joffre C, Barrow R, Menard L, Calleja V, Hart IR, Kermorgant S. A direct role for Met endocytosis in tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 827-837.
- 33 Graveel C, Su Y, Koeman J, Wang LM, Tessarollo L, Fiscella M *et al.* Activating Met mutations produce unique tumor profiles in mice with selective duplication of the mutant allele. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 17198-17203.
- 34 Zhuang Z, Park WS, Pack S, Schmidt L, Vortmeyer AO, Pak E *et al.* Trisomy 7-harboring non-random duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 1998; 20: 66-69.
- 35 Choueiri TK, Vaishampayan U, Rosenberg JE, Logan TF, Harzstark AL, Bukowski RM *et al.* Phase II and biomarker study of the dual MET/VEGFR2 inhibitor foretinib in patients with papillary renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2013; 31: 181-186.
- 36 Awad MM, Oxnard GR, Jackman DM, Savukoski DO, Hall D, Shivdasani P *et al.* MET Exon 14 Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer Are Associated With Advanced Age and Stage-

- Dependent MET Genomic Amplification and c-Met Overexpression. *J Clin Oncol* 2015; 34: 721-730.
- 37 Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, Chmielecki J, Lu X, Bauer TM *et al.* Activation of MET via Diverse Exon 14 Splicing Alterations Occurs in Multiple Tumor Types and Confers Clinical Sensitivity to MET Inhibitors. *Cancer discovery* 2015; 5: 850-859.
- 38 Tong JH, Yeung SF, Chan AW, Chung LY, Chau SL, Lung RW *et al.* MET amplification and exon 14 splice site mutation define unique molecular subgroups of Non-small Cell Lung Carcinoma with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 2016.
- 39 Vieira T, Antoine M, Ruppert AM, Fallet V, Duruisseaux M, Giroux Leprieur E *et al.* Blood vessel invasion is a major feature and a factor of poor prognosis in sarcomatoid carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2014; 85: 276-281.
- 40 Lee J, Ou SH, Lee JM, Kim HC, Hong M, Kim SY *et al.* Gastrointestinal malignancies harbor actionable MET exon 14 deletions. *Oncotarget* 2015; 6: 28211-28222.
- 41 Gandino L, Longati P, Medico E, Prat M, Comoglio PM. Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *J Biol Chem* 1994; 269: 1815-1820.
- 42 Hashigasako A, Machide M, Nakamura T, Matsumoto K. Bi-directional regulation of Ser-985 phosphorylation of c-met via protein kinase C and protein phosphatase 2A involves c-Met activation and cellular responsiveness to hepatocyte growth factor. *Journal of biological chemistry*, The 2004; 279: 26445-26452.
- 43 Nakayama M, Sakai K, Yamashita A, Nakamura T, Suzuki Y, Matsumoto K. Met/HGF receptor activation is regulated by juxtamembrane Ser985 phosphorylation in hepatocytes. *Cytokine* 2013; 62: 446-452.
- 44 Peschard P, Fournier TM, Lamorte L, Naujokas MA, Band H, Langdon WY *et al.* Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell* 2001; 8: 995-1004.
- 45 Lefebvre J, Muharram G, Leroy C, Kherrouche Z, Montagne R, Ichim G *et al.* Caspase-generated fragment of the Met receptor favors apoptosis via the intrinsic pathway independently of its tyrosine kinase activity. *Cell Death Dis* 2013; 4: e871.
- 46 Peschard P, Ishiyama N, Lin T, Lipkowitz S, Park M. 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: 29565-29571.
- 47 Kong-Beltran M, Seshagiri S, Zha J, Zhu W, Bhawe K, Mendoza N *et al.* Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 283-289.
- 48 Asaoka Y, Tada M, Ikenoue T, Seto M, Imai M, Miyabayashi K *et al.* Gastric cancer cell line Hs746T harbors a splice site mutation of c-Met causing juxtamembrane domain deletion. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394: 1042-1046.
- 49 Spoerke JM, O'Brien C, Huw L, Koeppen H, Fridlyand J, Brachmann RK *et al.* Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway alterations are associated with histologic subtypes and are predictive of sensitivity to PI3K inhibitors in lung cancer preclinical models. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 6771-6783.
- 50 Liu X, Jia Y, Stoopler MB, Shen Y, Cheng H, Chen J *et al.* Next-Generation Sequencing of Pulmonary Sarcomatoid Carcinoma Reveals High Frequency of Actionable MET Gene Mutations. *J Clin Oncol* 2015; 34: 794-802.
- 51 Togashi Y, Mizuuchi H, Tomida S, Terashima M, Hayashi H, Nishio K *et al.* MET gene exon 14 deletion created using the CRISPR/Cas9 system enhances cellular growth and sensitivity to a MET inhibitor. *Lung Cancer* 2015; 90: 590-597.
- 52 Jenkins RW, Oxnard GR, Elkin S, Sullivan EK, Carter JL, Barbie DA. Response to Crizotinib in a Patient With Lung Adenocarcinoma Harboring a MET Splice Site Mutation. *Clin Lung Cancer* 2015; 16: e101-104.
- 53 Jorge SE, Sol Schulman S, Freed JA, VanderLaan PA, Rangachari D, Kobayashi SS *et al.* Responses to the multitargeted MET/ALK/ROS1 inhibitor crizotinib and co-occurring mutations in lung adenocarcinomas with MET amplification or MET exon 14 skipping mutation. *Lung Cancer* 2015; 90: 369-374.

- 54 Mendenhall MA, Goldman JW. MET-Mutated NSCLC with Major Response to Crizotinib. *J Thorac Oncol* 2015; 10: e33-34.
- 55 Paik PK, Drilon A, Fan PD, Yu H, Rekhtman N, Ginsberg MS *et al.* Response to MET Inhibitors in Patients with Stage IV Lung Adenocarcinomas Harboring MET Mutations Causing Exon 14 Skipping. *Cancer discovery* 2015; 5: 842-849.
- 56 Waqar SN, Morgensztern D, Sehn J. MET Mutation Associated with Responsiveness to Crizotinib. *J Thorac Oncol* 2015; 10: e29-31.
- 57 Heist RS, Shim HS, Gingipally S, Mino-Kenudson M, Le L, Gainor JF *et al.* MET Exon 14 Skipping in Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist* 2016; 21: 481-486.
- 58 Mahjoubi L, Gazzah A, Besse B, Lacroix L, Soria JC. A never-smoker lung adenocarcinoma patient with a MET exon 14 mutation (D1028N) and a rapid partial response after crizotinib. *Invest New Drugs* 2016; 34: 397-398.
- 59 Shea M, Huberman MS, Costa DB. Lazarus-Type Response to Crizotinib in a Patient with Poor Performance Status and Advanced MET Exon 14 Skipping Mutation-Positive Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2016.
- 60 Krishnaswamy S, Kanteti R, Duke-Cohan JS, Loganathan S, Liu W, Ma PC *et al.* Ethnic differences and functional analysis of MET mutations in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5714-5723.
- 61 Tyner JW, Fletcher LB, Wang EQ, Yang WF, Rutenberg-Schoenberg ML, Beadling C *et al.* MET receptor sequence variants R970C and T992I lack transforming capacity. *Cancer Res* 2010; 70: 6233-6237.
- 62 Shieh JM, Tang YA, Yang TH, Chen CY, Hsu HS, Tan YH *et al.* Lack of association of C-Met-N375S sequence variant with lung cancer susceptibility and prognosis. *Int J Med Sci* 2013; 10: 988-994.
- 63 Boland JM, Jang JS, Li J, Lee AM, Wampfler JA, Erickson-Johnson MR *et al.* MET and EGFR mutations identified in ALK-rearranged pulmonary adenocarcinoma: molecular analysis of 25 ALK-positive cases. *J Thorac Oncol* 2013; 8: 574-581.
- 64 Lee JH, Han SU, Cho H, Jennings B, Gerrard B, Dean M *et al.* A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer. *Oncogene* 2000; 19: 4947-4953.
- 65 Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD *et al.* c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer research* 2003; 63: 6272-6281.
- 66 Montagne R, Baranzelli A, Muharram G, Catherine L, Lesaffre M, Vinchent A *et al.* MET receptor variant R970C favors calpain-dependent generation of a fragment promoting epithelial cell scattering. *Oncotarget* 2017.
- 67 Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, Taylor G, Klineberg E, Hudson EA *et al.* Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res* 1997; 57: 5391-5398.
- 68 Rosen EM, Laterra J, Joseph A, Jin L, Fuchs A, Way D *et al.* Scatter factor expression and regulation in human glial tumors. *International journal of cancer* 1996; 67: 248-255.
- 69 Lamszus K, Schmidt NO, Jin L, Laterra J, Zagzag D, Way D *et al.* Scatter factor promotes motility of human glioma and neuromicrovascular endothelial cells. *International journal of cancer* 1998; 75: 19-28.
- 70 Laterra J, Rosen E, Nam M, Ranganathan S, Fielding K, Johnston P. Scatter factor/hepatocyte growth factor expression enhances human glioblastoma tumorigenicity and growth. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235: 743-747.
- 71 Zhang Y, Farenholtz KE, Yang Y, Guessous F, Dipierro CG, Calvert VS *et al.* Hepatocyte growth factor sensitizes brain tumors to c-MET kinase inhibition. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 1433-1444.
- 72 Xie Q, Bradley R, Kang L, Koeman J, Ascierto ML, Worschech A *et al.* Hepatocyte growth factor (HGF) autocrine activation predicts sensitivity to MET inhibition in glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; 109: 570-575.

- 73 Brockmann MA, Papadimitriou A, Brandt M, Fillbrandt R, Westphal M, Lamszus K. Inhibition of intracerebral glioblastoma growth by local treatment with the scatter factor/hepatocyte growth factor-antagonist NK4. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4578-4585.
- 74 Cao B, Su Y, Oskarsson M, Zhao P, Kort EJ, Fisher RJ *et al.* Neutralizing monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) display antitumor activity in animal models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98: 7443-7448.
- 75 Kim KJ, Wang L, Su YC, Gillespie GY, Salhotra A, Lal B *et al.* Systemic anti-hepatocyte growth factor monoclonal antibody therapy induces the regression of intracranial glioma xenografts. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1292-1298.
- 76 Martens T, Schmidt NO, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R *et al.* A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6144-6152.
- 77 Abounader R, Ranganathan S, Lal B, Fielding K, Book A, Dietz H *et al.* Reversion of human glioblastoma malignancy by U1 small nuclear RNA/ribozyme targeting of scatter factor/hepatocyte growth factor and c-met expression. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1548-1556.
- 78 Abounader R, Lal B, Luddy C, Koe G, Davidson B, Rosen EM *et al.* In vivo targeting of SF/HGF and c-met expression via U1snRNA/ribozymes inhibits glioma growth and angiogenesis and promotes apoptosis. *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, The* 2002; 16: 108-110.
- 79 Wen PY, Schiff D, Cloughesy TF, Raizer JJ, Laterra J, Smitt M *et al.* A phase II study evaluating the efficacy and safety of AMG 102 (rilotumumab) in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol* 2011; 13: 437-446.
- 80 Cloughesy T, Finocchiaro G, Belda-Iniesta C, Recht L, Brandes AA, Pineda E *et al.* Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Phase II Study of Onartuzumab Plus Bevacizumab Versus Placebo Plus Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: Efficacy, Safety, and Hepatocyte Growth Factor and O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Biomarker Analyses. *J Clin Oncol* 2017; 35: 343-351.
- 81 Ellingson BM, Harris RJ, Woodworth DC, Leu K, Zaw O, Mason WP *et al.* Baseline pretreatment contrast enhancing tumor volume including central necrosis is a prognostic factor in recurrent glioblastoma: evidence from single and multicenter trials. *Neuro Oncol* 2017; 19: 89-98.
- 82 Cooper CS, Tempest PR, Beckman MP, Heldin CH, Brookes P. Amplification and overexpression of the met gene in spontaneously transformed NIH3T3 mouse fibroblasts. *Embo J* 1986; 5: 2623-2628.
- 83 Giordano S, Ponzetto C, Di Renzo MF, Cooper CS, Comoglio PM. Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein. *Nature* 1989; 339: 155-156.
- 84 Zhao X, Weir BA, LaFramboise T, Lin M, Beroukhi R, Garraway L *et al.* Homozygous deletions and chromosome amplifications in human lung carcinomas revealed by single nucleotide polymorphism array analysis. *Cancer Res* 2005; 65: 5561-5570.
- 85 Ponzetto C, Giordano S, Peverali F, Della Valle G, Abate ML, Vaula G *et al.* c-met is amplified but not mutated in a cell line with an activated met tyrosine kinase. *Oncogene* 1991; 6: 553-559.
- 86 Rege-Cambrin G, Scaravaglio P, Carozzi F, Giordano S, Ponzetto C, Comoglio PM *et al.* Karyotypic analysis of gastric carcinoma cell lines carrying an amplified c-met oncogene. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 64: 170-173.
- 87 Smolen GA, Sordella R, Muir B, Mohapatra G, Barmettler A, Archibald H *et al.* Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103: 2316-2321.
- 88 Lutterbach B, Zeng Q, Davis LJ, Hatch H, Hang G, Kohl NE *et al.* Lung Cancer Cell Lines Harboring MET Gene Amplification Are Dependent on Met for Growth and Survival. *Cancer Res* 2007; 67: 2081-2088.
- 89 Takayama H, LaRochelle WJ, Sharp R, Otsuka T, Kriebel P, Anver M *et al.* Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte

- growth factor/scatter factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1997; 94: 701-706.
- 90 Wang R, Ferrell LD, Faouzi S, Maher JJ, Bishop JM. Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J Cell Biol* 2001; 153: 1023-1034.
- 91 Fan Y, Arechederra M, Richelme S, Daian F, Novello C, Calderaro J *et al.* A Phosphokinome-based screen uncovers new drug synergies for cancer driven by liver-specific gain of non-oncogenic RTKs. *Hepatology* 2017.
- 92 Smolen GA, Muir B, Mohapatra G, Barmettler A, Kim WJ, Rivera MN *et al.* Frequent met oncogene amplification in a Brca1/Trp53 mouse model of mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 2006; 66: 3452-3455.
- 93 Schuller AG, Barry ER, Jones RD, Henry RE, Frigault MM, Beran G *et al.* The MET Inhibitor AZD6094 (Savolitinib, HMPL-504) Induces Regression in Papillary Renal Cell Carcinoma Patient-Derived Xenograft Models. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 2811-2819.
- 94 Drilon A, Cappuzzo F, Ou SI, Camidge DR. Targeting MET in Lung Cancer: Will Expectations Finally Be MET? *J Thorac Oncol* 2017; 12: 15-26.
- 95 Schildhaus HU, Schultheis AM, Ruschoff J, Binot E, Merkelbach-Bruse S, Fassunke J *et al.* MET amplification status in therapy-naïve adeno- and squamous cell carcinomas of the lung. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 907-915.
- 96 Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, Rossi E, Gajapathy S, Felicioni L *et al.* Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1667-1674.
- 97 Tsuta K, Kozu Y, Mimae T, Yoshida A, Kohno T, Sekine I *et al.* c-MET/phospho-MET protein expression and MET gene copy number in non-small cell lung carcinomas. *J Thorac Oncol* 2012; 7: 331-339.
- 98 Dimou A, Non L, Chae YK, Tester WJ, Syrigos KN. MET gene copy number predicts worse overall survival in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC); a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9: e107677.
- 99 Noonan SA, Berry L, Lu X, Gao D, Baron AE, Chesnut P *et al.* Identifying the Appropriate FISH Criteria for Defining MET Copy Number-Driven Lung Adenocarcinoma through Oncogene Overlap Analysis. *J Thorac Oncol* 2016; 11: 1293-1304.
- 100 Park S, Koh J, Kim DW, Kim M, Keam B, Kim TM *et al.* MET amplification, protein expression, and mutations in pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2015; 90: 381-387.
- 101 Pyo JS, Kang G, Cho H. Clinicopathological Significance and Diagnostic Accuracy of c-MET Expression by Immunohistochemistry in Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *J Gastric Cancer* 2016; 16: 141-151.
- 102 Li Y, Li W, He Q, Xu Y, Ren X, Tang X *et al.* Prognostic value of MET protein overexpression and gene amplification in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* 2015; 6: 13309-13319.
- 103 Burel-Vandenbos F, Ngo-Mai M, Dadone B, Di Mauro I, Gimet S, Saada-Bouزيد E *et al.* MET immunolabelling is a useful predictive tool for MET gene amplification in glioblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2017; 43: 252-266.
- 104 Kondo S, Ojima H, Tsuda H, Hashimoto J, Morizane C, Ikeda M *et al.* Clinical impact of c-Met expression and its gene amplification in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2013; 18: 207-213.
- 105 Wang K, Lim HY, Shi S, Lee J, Deng S, Xie T *et al.* Genomic landscape of copy number aberrations enables the identification of oncogenic drivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013; 58: 706-717.
- 106 Raghav K, Morris V, Tang C, Morelli P, Amin HM, Chen K *et al.* MET amplification in metastatic colorectal cancer: an acquired response to EGFR inhibition, not a de novo phenomenon. *Oncotarget* 2016; 7: 54627-54631.
- 107 Schmitz K, Koeppen H, Binot E, Fassunke J, Kunstlinger H, Ihle MA *et al.* MET gene copy number alterations and expression of MET and hepatocyte growth factor are potential biomarkers in angiosarcomas and undifferentiated pleomorphic sarcomas. *PLoS One* 2015; 10: e0120079.

- 108 Yin X, Zhang T, Su X, Ji Y, Ye P, Fu H *et al.* Relationships between Chromosome 7 Gain, MET Gene Copy Number Increase and MET Protein Overexpression in Chinese Papillary Renal Cell Carcinoma Patients. *PLoS One* 2015; 10: e0143468.
- 109 Catenacci DV, Ang A, Liao WL, Shen J, O'Day E, Loberg RD *et al.* MET tyrosine kinase receptor expression and amplification as prognostic biomarkers of survival in gastroesophageal adenocarcinoma. *Cancer* 2017; 123: 1061-1070.
- 110 Lee J, Tran P, Klempner SJ. Targeting the MET Pathway in Gastric and Oesophageal Cancers: Refining the Optimal Approach. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2016; 28: e35-44.
- 111 Liu YJ, Shen D, Yin X, Gavine P, Zhang T, Su X *et al.* HER2, MET and FGFR2 oncogenic driver alterations define distinct molecular segments for targeted therapies in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 2014; 110: 1169-1178.
- 112 Veenstra C, Perez-Tenorio G, Stelling A, Karlsson E, Mirwani SM, Nordenskoljd B *et al.* Met and its ligand HGF are associated with clinical outcome in breast cancer. *Oncotarget* 2016; 7: 37145-37159.
- 113 Kwak Y, Kim SI, Park CK, Paek SH, Lee ST, Park SH. C-MET overexpression and amplification in gliomas. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 14932-14938.
- 114 Caparica R, Yen CT, Coudry R, Ou SI, Varella-Garcia M, Camidge DR *et al.* Responses to Crizotinib Can Occur in High-Level MET-Amplified Non-Small Cell Lung Cancer Independent of MET Exon 14 Alterations. *J Thorac Oncol* 2017; 12: 141-144.
- 115 Lennerz JK, Kwak EL, Ackerman A, Michael M, Fox SB, Bergethon K *et al.* MET amplification identifies a small and aggressive subgroup of esophagogastric adenocarcinoma with evidence of responsiveness to crizotinib. *J Clin Oncol* 2011; 29: 4803-4810.
- 116 Zhang Y, Wang W, Wang Y, Xu Y, Tian Y, Huang M *et al.* Response to Crizotinib Observed in Lung Adenocarcinoma with MET Copy Number Gain but without a High-Level MET/CEP7 Ratio, MET Overexpression, or Exon 14 Splicing Mutations. *J Thorac Oncol* 2016; 11: e59-62.
- 117 Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO *et al.* MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007; 316: 1039-1043.
- 118 Bardelli A, Corso S, Bertotti A, Hobor S, Valtorta E, Siravegna G *et al.* Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer discovery* 2013; 3: 658-673.
- 119 Tanaka A, Sueoka-Aragane N, Nakamura T, Takeda Y, Mitsuoka M, Yamasaki F *et al.* Co-existence of positive MET FISH status with EGFR mutations signifies poor prognosis in lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* 2012; 75: 89-94.
- 120 Gainor JF, Niederst MJ, Lennerz JK, Dagogo-Jack I, Stevens S, Shaw AT *et al.* Dramatic Response to Combination Erlotinib and Crizotinib in a Patient with Advanced, EGFR-Mutant Lung Cancer Harboring De Novo MET Amplification. *J Thorac Oncol* 2016; 11: e83-85.
- 121 Trusolino L. Oncogenic MET as an Effective Therapeutic Target in Non-Small Cell Lung Cancer Resistant to EGFR Inhibitors: The Rise of the Phoenix. *Cancer discovery* 2016; 6: 1306-1308.
- 122 Pelosi G, Gasparini P, Conte D, Fabbri A, Perrone F, Tamborini E *et al.* Synergistic Activation upon MET and ALK Coamplification Sustains Targeted Therapy in Sarcomatoid Carcinoma, a Deadly Subtype of Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2016; 11: 718-728.
- 123 Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM *et al.* Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 1984; 311: 29-33.
- 124 Vigna E, Gramaglia D, Longati P, Bardelli A, Comoglio PM. Loss of the exon encoding the juxtamembrane domain is essential for the oncogenic activation of TPR-MET. *Oncogene* 1999; 18: 4275-4281.
- 125 Peschard P, Park M. From Tpr-Met to Met, tumorigenesis and tubes. *Oncogene* 2007; 26: 1276-1285.
- 126 Heideman DA, Snijders PJ, Bloemena E, Meijer CJ, Offerhaus GJ, Meuwissen SG *et al.* Absence of tpr-met and expression of c-met in human gastric mucosa and carcinoma. *Journal of pathology, The* 2001; 194: 428-435.

- 127 Bao ZS, Chen HM, Yang MY, Zhang CB, Yu K, Ye WL *et al.* RNA-seq of 272 gliomas revealed a novel, recurrent PTPRZ1-MET fusion transcript in secondary glioblastomas. *Genome Res* 2014; 24: 1765-1773.
- 128 Chen HM, Yu K, Tang XY, Bao ZS, Jiang T, Fan XL *et al.* Enhanced expression and phosphorylation of the MET oncoprotein by glioma-specific PTPRZ1-MET fusions. *FEBS Lett* 2015; 589: 1437-1443.
- 129 Project ICGCPT. Recurrent MET fusion genes represent a drug target in pediatric glioblastoma. *Nat Med* 2016; 22: 1314-1320.
- 130 Yeh I, Botton T, Talevich E, Shain AH, Sparatta AJ, de la Fouchardiere A *et al.* Activating MET kinase rearrangements in melanoma and Spitz tumours. *Nat Commun* 2015; 6: 7174.
- 131 Davies KD, Ng TL, A. E-B, A.T. L, P.R. E, Camidge DR *et al.* Dramatic response to crizotinib in patient with lung cancer positive for an *HLA-DRB1-MET* gene fusion. *JCO Precision Oncology* 2017: 1-6.
- 132 Cortot AB, Janne PA. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *Eur Respir Rev* 2014; 23: 356-366.
- 133 Heist RS, Sequist LV, Borger D, Gainor JF, Arellano RS, Le LP *et al.* Acquired Resistance to Crizotinib in NSCLC with MET Exon 14 Skipping. *J Thorac Oncol* 2016; 11: 1242-1245.
- 134 Dong HJ, Li P, Wu CL, Zhou XY, Lu HJ, Zhou T. Response and acquired resistance to crizotinib in Chinese patients with lung adenocarcinomas harboring MET Exon 14 splicing alternations. *Lung Cancer* 2016; 102: 118-121.
- 135 Bahcall M, Sim T, Paweletz CP, Patel JD, Alden RS, Kuang Y *et al.* Acquired METD1228V Mutation and Resistance to MET Inhibition in Lung Cancer. *Cancer discovery* 2016; 6: 1334-1341.
- 136 Ou SI, Young L, Schrock AB, Johnson A, Klempner SJ, Zhu VW *et al.* Emergence of Preexisting MET Y1230C Mutation as a Resistance Mechanism to Crizotinib in NSCLC with MET Exon 14 Skipping. *J Thorac Oncol* 2017; 12: 137-140.
- 137 Li A, Yang JJ, Zhang XC, Zhang Z, Su J, Gou LY *et al.* Acquired MET Y1248H and D1246N Mutations Mediate Resistance to MET Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2017.
- 138 Qi J, McTigue MA, Rogers A, Lifshits E, Christensen JG, Janne PA *et al.* Multiple mutations and bypass mechanisms can contribute to development of acquired resistance to MET inhibitors. *Cancer Res* 2011; 71: 1081-1091.
- 139 Tiedt R, Degenkolbe E, Furet P, Appleton BA, Wagner S, Schoepfer J *et al.* A drug resistance screen using a selective MET inhibitor reveals a spectrum of mutations that partially overlap with activating mutations found in cancer patients. *Cancer Res* 2011; 71: 5255-5264.
- 140 Funakoshi Y, Mukohara T, Tomioka H, Ekyalongo RC, Kataoka Y, Inui Y *et al.* Excessive MET signaling causes acquired resistance and addiction to MET inhibitors in the MKN45 gastric cancer cell line. *Invest New Drugs* 2013; 31: 1158-1168.
- 141 McDermott U, Pusapati RV, Christensen JG, Gray NS, Settleman J. Acquired resistance of non-small cell lung cancer cells to MET kinase inhibition is mediated by a switch to epidermal growth factor receptor dependency. *Cancer Res* 2010; 70: 1625-1634.
- 142 Benderra MA, Aspeslagh S, Postel-Vinay S, Bigot L, De Baere T, Loriot Y *et al.* Acquired EGFR Mutation as the Potential Resistance Driver to Crizotinib in a MET-Mutated Tumor. *J Thorac Oncol* 2016; 11: e21-23.
- 143 Nakamura Y, Niki T, Goto A, Morikawa T, Miyazawa K, Nakajima J *et al.* c-Met activation in lung adenocarcinoma tissues: an immunohistochemical analysis. *Cancer Sci* 2007; 98: 1006-1013.
- 144 Lapere C, Cortot AB, Gregoire V, Cockenpot V, Tulasne D, Copin MC. Preferential Localization of MET Expression at the Invasion Front and in Spreading Cells Through Air Spaces in Non-Small Cell Lung Carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2017; 41: 414-422.
- 145 Benedettini E, Sholl LM, Peyton M, Reilly J, Ware C, Davis L *et al.* Met activation in non-small cell lung cancer is associated with de novo resistance to EGFR inhibitors and the development of brain metastasis. *Am J Pathol* 2010; 177: 415-423.

- 146 Tran TN, Selinger CI, Kohonen-Corish MR, McCaughan B, Kennedy C, O'Toole SA *et al.* Alterations of MET Gene Copy Number and Protein Expression in Primary Non-Small-Cell Lung Cancer and Corresponding Nodal Metastases. *Clin Lung Cancer* 2016; 17: 30-38 e31.
- 147 Tulasne D, Foveau B. The shadow of death on the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ* 2008; 15: 427-434.
- 148 Drilon AE, Camidge RD, Ou SHI, Clark JW, Socinski MA, Weiss J *et al.* Efficacy and safety of crizotinib in patients (pts) with advanced MET exon 14-altered non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2016; 34 (suppl; abstr 108): ASCO Annual Meeting.
- 149 Cortot AB, Kherrouche Z, Descarpentries C, Wislez M, Baldacci S, Furlan A *et al.* Exon 14 deleted MET receptor as a new biomarker and target in cancers. *J Natl Cancer Inst* 2017; 109.
- 150 Apicella M, Migliore C, Capeloa T, Menegon S, Cargnelutti M, Degiuli M *et al.* Dual MET/EGFR therapy leads to complete response and resistance prevention in a MET-amplified gastroesophageal xenopatient cohort. *Oncogene* 2017; 36: 1200-1210.

Legends

Figure 1: Schematic representation of the different molecular mechanisms inducing addiction to the MET receptor. These include (i) *MET* gene amplification, observed mainly in gastric and lung cancers in about 3% of patients, (ii) an HGF autocrine loop, described mainly in glioblastomas, (iii) MET mutations affecting either the kinase domain (in more than 10% of papillary renal cell carcinomas) or the splicing site of the MET exon 14, leading to deletion of part of the juxtamembrane domain, (iv) generation of MET fusion proteins through chromosomal rearrangement, leading notably to MET kinase dimerization.

Table 1: MET mutations in cancers. List of the MET mutations described in cancers, with their positions in the MET sequence, their functional effects on MET activity, and their involvement in resistance to targeted therapies.

Figure 2: Positions of MET mutations in the 3D structure of the kinase domain, along with the position of ATP. MET mutations were inserted into the raw PDB data for MET (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank DOI: 10.2210/pdb3dkc/pdb) by Swiss.Pdbviewers 4.1.0 software and viewed by NGL Viewer software.

Figure 3: Massive MET expression in the Hs746T gastric adenocarcinoma cell line having a MET gene amplification. (A) Immunohistochemistry applied to Hs746T cells with an antibody directed against the phosphorylated form of MET (anti-phospho-MET Y1234/1235, D26, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), revealing constitutive activation of the MET receptor in this cell line (x200). (B) Fluorescence in situ Hybridization (FISH) applied to Hs746T cells with the SPEC *MET/CEN7* dual color Zytolight probe (Spectrum orange *CEN7*/ Spectrum green *MET*) demonstrates *MET* gene amplification (x400). A representative cell is surrounded.

Figure 4: Schematic representation of MET fusions. (A) Representation of the main functional domains of MET, including the SEMA domain, the PSI domain (Plexins, Semaphorins and Integrins), the four IPT domains (Immunoglobulin-like fold shared by plexins and transcription factors), the transmembrane domain (TM), the regulatory juxtamembrane domain (juxta), the kinase domain, and the C-terminal domain (CT). The *MET* sequence at the point of fusion, including in red the start codon, is represented with the different exons of PTPRZ1. (B) Representation of the TPR-MET chimera at the origin of MET receptor discovery, with the *MET* sequence at the point of fusion. Similar points of fusion have been described for TFG-, CLIP2-, ZKSCAN1-, PPFIBP1-, TRIM4-, LRRFIP1-, EPS15-, DCTN1- and HLA-DRB1-MET chimeras. The cancers displaying each fusion are listed.

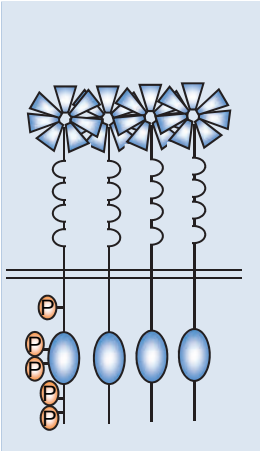
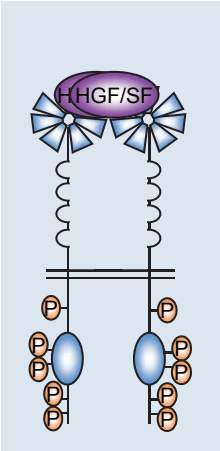
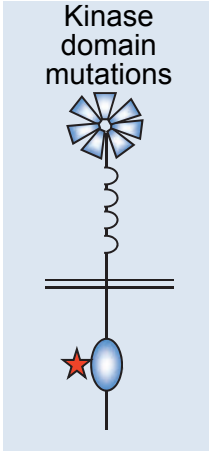
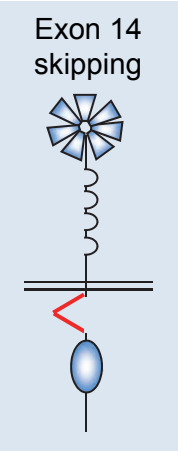
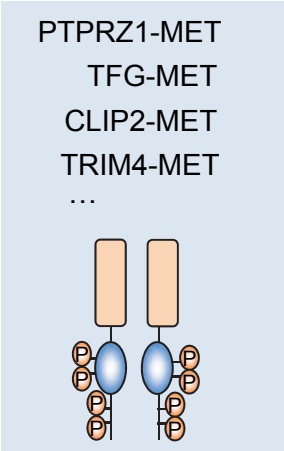
	MET gene amplification	HGF autocrine loop	MET mutations		MET fusions
MET activation mechanisms					<p>PTPRZ1-MET TFG-MET CLIP2-MET TRIM4-MET ...</p> 
Cancer types and prevalence	-Gastric ~3%, -Lung ~3%	Glioblastoma	papillary renal carcinoma ~10%	-Lung ~3% -Gastric -Colorectal -Glioma	-Glioblastoma -Melanoma -Lung ~1%

Figure 1

Domain	Position	Cancer	Functional consequence	Involved in resistance	Reference
Sema	E168D (150)	Small cell lung cancer			Ma 2003
	N375S (357)	Mesothelioma	Possible polymorphism		Jagadeeswaran 2006
	M431V (413)	Mesothelioma			Jagadeeswaran 2006
	N454I (436)	Mesothelioma			Jagadeeswaran 2006
Juxta-membrane	R988C (970)	Lung cancer	Promote calpain cleavage and generation of an active fragment /Non addictive		Ma 2003, Tjin 2006, Montagne 2017
	T1010I (992)	Lung cancer, RCC, Breast cancer, mesothelioma			Schmidt 1999, Lee 2000, Ma 2003, Wasenius 2005, Tengs T 2006, Jagadeeswaran 2006
	More than 130 alterations altering Exon 14 slicing	NSCLC, gastric cancer, colorectal cancer, glioma	Deletion of the juxtamembrane domain leading to receptor activation		Ma 2003, Kong-Beltran 2006, Onozato 2009, Network TCGA 2014, Frampton 2015, Lee 2015, Schrock 2016
Kinase	V1110I (1092)	pRCC	Kinase activation		Schmidt 1999, Olivero 199
	H1112Y/R/L (1094)	pRCC	Kinase activation (weak)		Schmidt 1999, Berthou 2004, Lorenzato 2002
	N1118Y (1100)	metastasis	Kinase activation		Lorenzato 2002
	H1124D (1106)	pRCC	Kinase activation (weak)		Schmidt 1999
	M1149T (1131)	pRCC	Kinase activation (weak)		Schmidt 1997, Jeffers 1997, Giordano 2000
	V1206L (1188)	pRCC	Kinase activation (weak)		Schmidt 1997, Jeffers 1997
	L1213V (1195)	pRCC	Kinase activation		Schmidt 1997, Bardelli 1998, Jeffers 1999, Giordano 2000, berthou 2004
	V1238I (1220)	pRCC	Kinase activation		Schmidt 1997, Jeffers 1997, schmidt 1999
	D1246H/V/N (1228)	pRCC	Kinase activation	Resistance to MET TKI in the context of <i>MET</i> amplification and Exon 14 skipping	Schmidt 1997, Jeffers 1997, Baerdelli 1998, maritano 2000, Giordano 2000
	Y1248H/D/C (1230)	pRCC, Oropharyngeal squamous cell carcinoma	Kinase activation		Schmidt 1997, Schmidt 1999, Jeffers 1997, Bardelli 1998, Di Renzo 2000, Giordano 2000, Lorenzato 2002,
	Y1253D (1235)	Oropharyngeal squamous cell carcinoma	Kinase activation		Di Renzo 2000, Lorenzato 2002, Aebersold 2003, Cristiani 2005
	K1262R (1244)	Child hepatocarcinoma	Kinase activation		Park 1999, maritano 2000
	M1268T/I (1250)	pRCC, Child hepatocarcinoma	Kinase activation		Schmidt 1997, Jeffers 1997, Bardelli 1998, schmidt 1999, Jeffers 1999, Nakaigawa 2000, Giordano 2000, ,Park 1999, Berthou 2004, Maritano 2000

Table 1

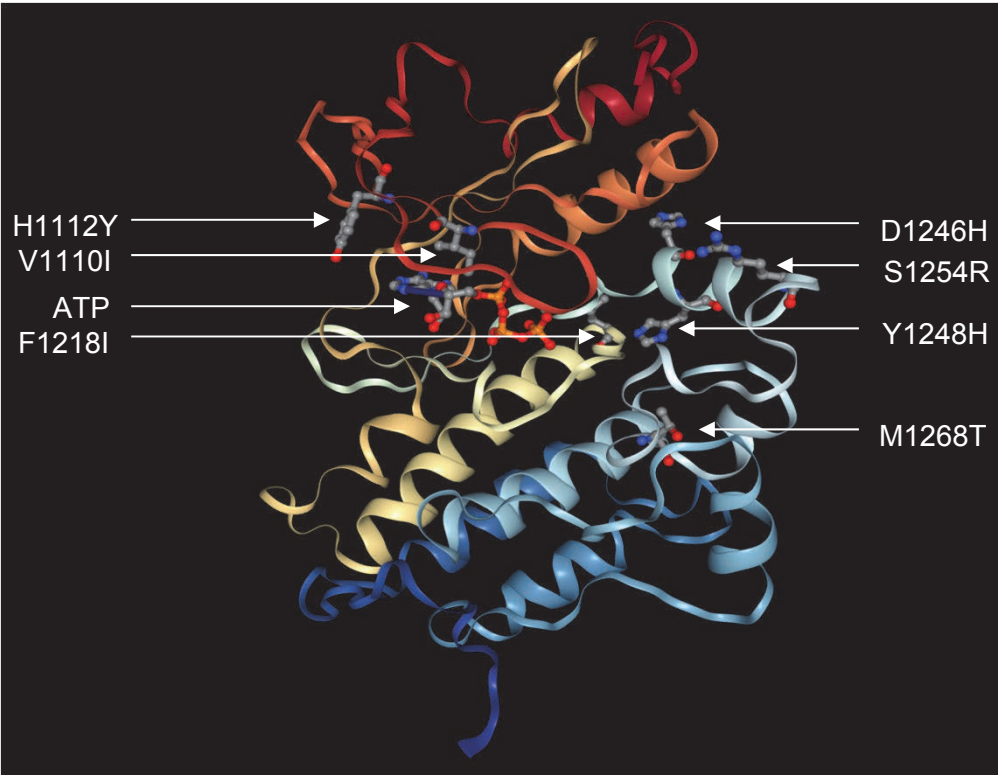
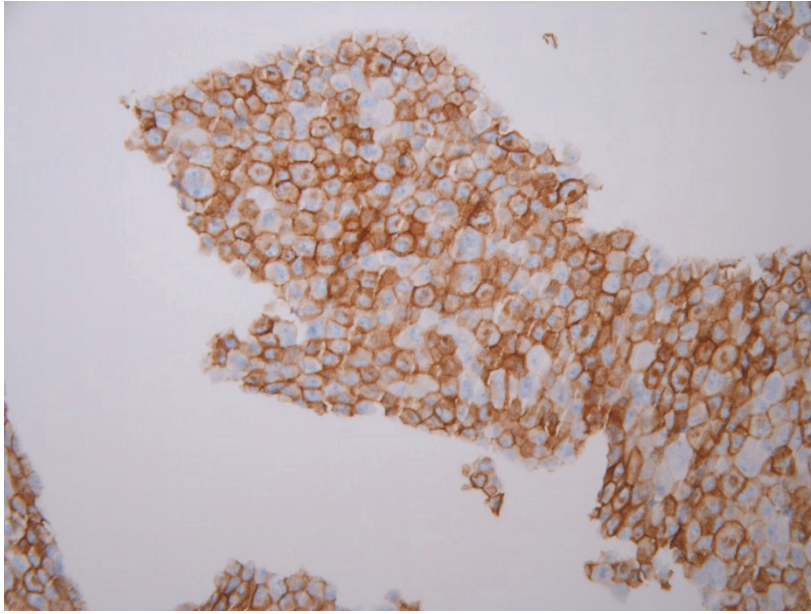


Figure 2

A



B

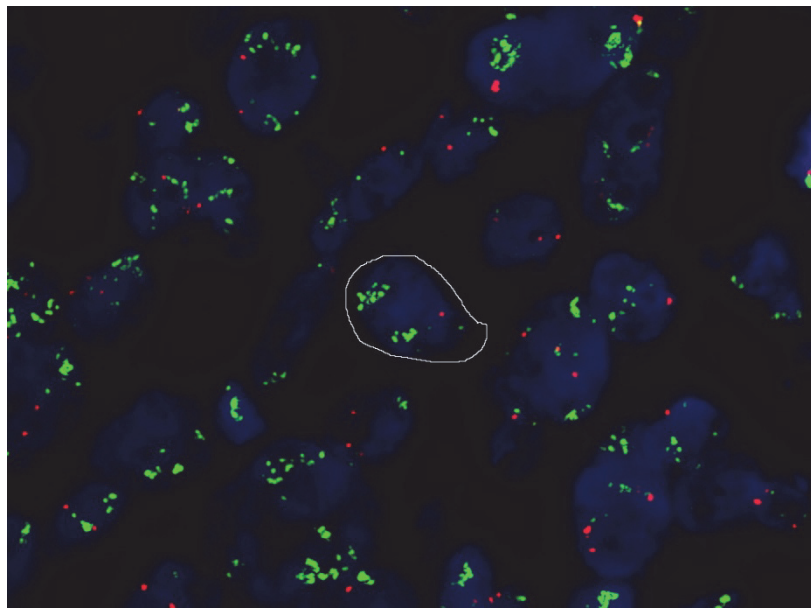


Figure 3

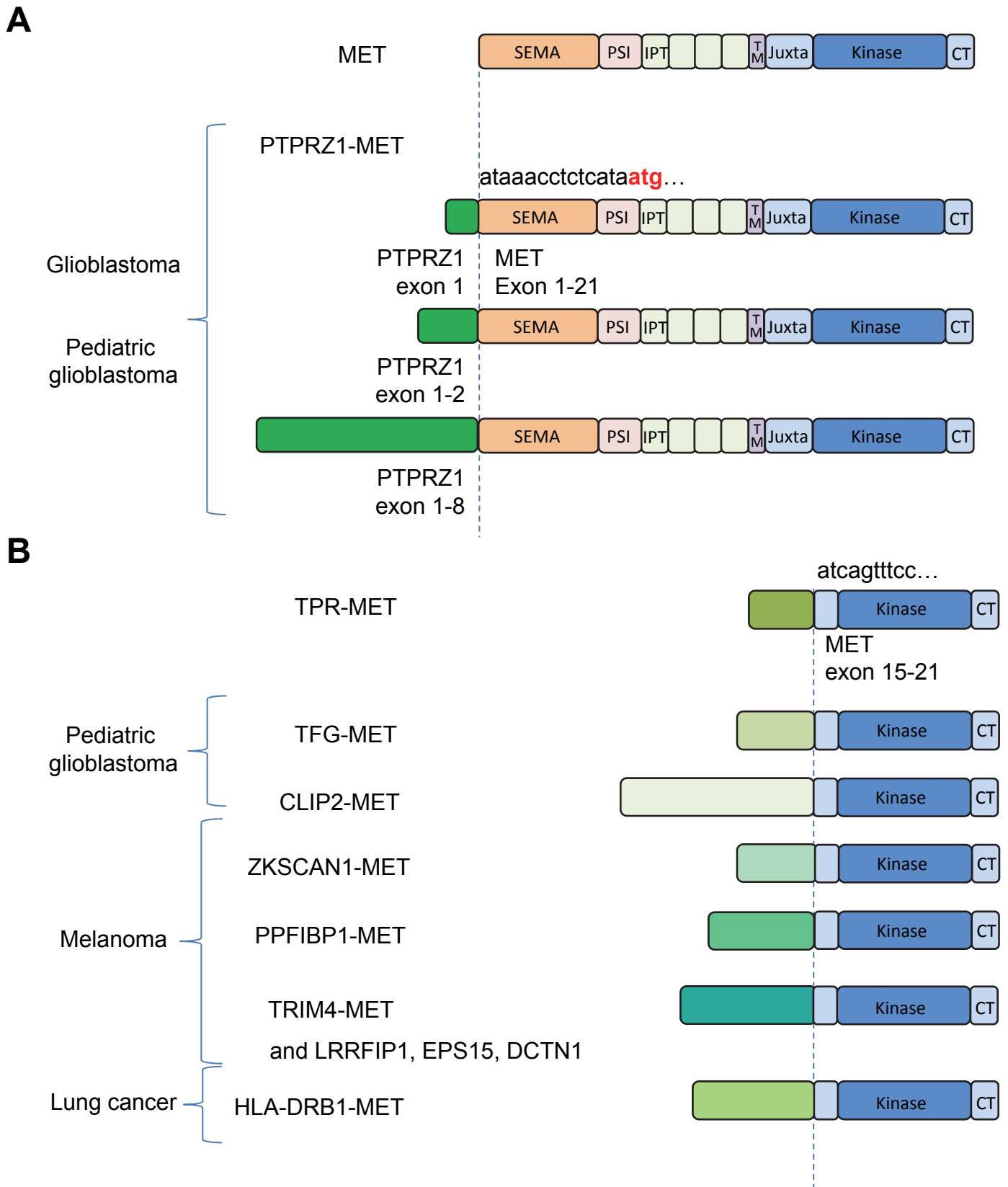


Figure 4

III – Le processus d'apoptose

A – Caractéristiques de l'apoptose

A.1. Généralités

C'est en 1972 qu'a été proposé pour la première fois le terme d'« Apoptose » par Kerr, Wyllie et Currie afin de décrire un type de mort cellulaire programmée aux caractéristiques morphologiques très particulières (Kerr et al., 1972). Depuis, un grand nombre d'études ont montré que l'apoptose était nécessaire au développement normal d'un organisme ainsi qu'au maintien de l'homéostasie (Voir la revue : Conradt, 2009). L'apoptose va survenir dès le stade embryonnaire, notamment lors du développement du système nerveux, mais également à l'âge adulte afin d'éliminer les cellules lésées. Il est aujourd'hui bien établi que l'altération du processus d'apoptose joue un rôle prépondérant dans le développement de nombreuses pathologies comme les maladies auto-immunes, les maladies neurodégénératives ou encore le cancer (Fuchs and Steller, 2011).

Au cours de l'apoptose, la cellule va subir plusieurs changements morphologiques. Au début du processus d'apoptose la cellule va s'arrondir et sa taille se réduire. Dans le noyau, la chromatine va se condenser puis se fragmenter. Ce phénomène de pycnose est très caractéristique de l'apoptose. Puis, la membrane plasmique de la cellule va bourgeonner pour former les corps apoptotiques contenant les débris cellulaires (organelles et fragments nucléaires). Ces corps apoptotiques, structurellement intacts, vont être phagocytés par les macrophages et dégradés. Ainsi, l'apoptose ne provoque pas d'inflammation contrairement à la nécrose car l'intégrité des membranes formant les corps apoptotiques prévient le relargage des constituants intracellulaires (Elmore, 2007).

A.2. Les caspases

Les caspases (*cysteiny l aspartate-cleaving proteases*) jouent un rôle prépondérant dans le processus d'apoptose. Elles font partie de la famille des cystéine-protéases car elles possèdent un résidu cystéine au cœur de leur site catalytique. Elles sont capables de cliver un large éventail de substrats suite à la reconnaissance d'un motif constitué de 4 acides aminés. Ainsi, elles vont être responsables de la plupart des modifications morphologiques observées durant l'apoptose. La famille

des caspases comprend plusieurs membres dont le nombre varie entre les espèces. Dans l'ensemble, elles sont exprimées dans la totalité de l'organisme à l'exception de la caspase 14 dont l'expression est limitée aux kératinocytes (Denecker et al., 2007).

A.2.1. Structure et activation des caspases

Les caspases sont synthétisées sous forme d'un précurseur inactif constitué d'un pro-domaine N-terminal de longueur variable, suivi de deux domaines nommés p20 et p10 en raison de leur masse moléculaire de 20 kDa et 10 kDa respectivement (Figure 16). A la suite de leur clivage au niveau de sites spécifiques (Asp-X), situés entre les différentes sous-unités, les caspases vont devenir actives et former un hétéro-tétramère composé de deux hétérodimères (p20/p10). Ces deux hétérodimères se positionnent en configuration tête-bêche localisant les deux sites actifs aux extrémités de la molécule formée (Thornberry, 1998) (Figure 16). Le pro-domaine est quant à lui libéré. Les différentes caspases sont conservées entre les mammifères et sont classées en 3 groupes en rapport à leur fonction et à la longueur de leur pro-domaine : les caspases initiatrices, les caspases effectrices et les caspases inflammatoires (Zmasek et al., 2007). Les caspases initiatrices et inflammatoires possèdent un long pro-domaine comprenant deux motifs DED (*death effector domain*) ou un motif CARD (*caspase recruitment domain*) impliqués dans les interactions protéine-protéine. Ainsi, le double motif DED est présent sur les caspases 8 et 10 et va permettre leur liaison avec des molécules adaptatrices, de type FADD ou TRADD, elles même recrutées par les récepteurs de mort (Muzio et al., 1996; Sprick et al., 2002). Ces deux caspases vont alors participer à l'induction de l'apoptose par la voie extrinsèque (qui sera détaillée dans la prochaine partie (III-B)). De la même manière, le motif CARD, présent sur les caspases 1, 2, 4, 5, 9, 11 et 12, va permettre leur interaction avec diverses molécules adaptatrices. Parmi elles, certaines ne participent pas à l'apoptose mais régulent l'inflammation, c'est le cas des caspases 1, 4, 5 et 12. A l'inverse, les caspases effectrices (3, 6 et 7) possèdent un pro-domaine beaucoup plus court (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004). Ces caspases vont être clivées et activées par les caspases initiatrices (Lavrik et al., 2005).

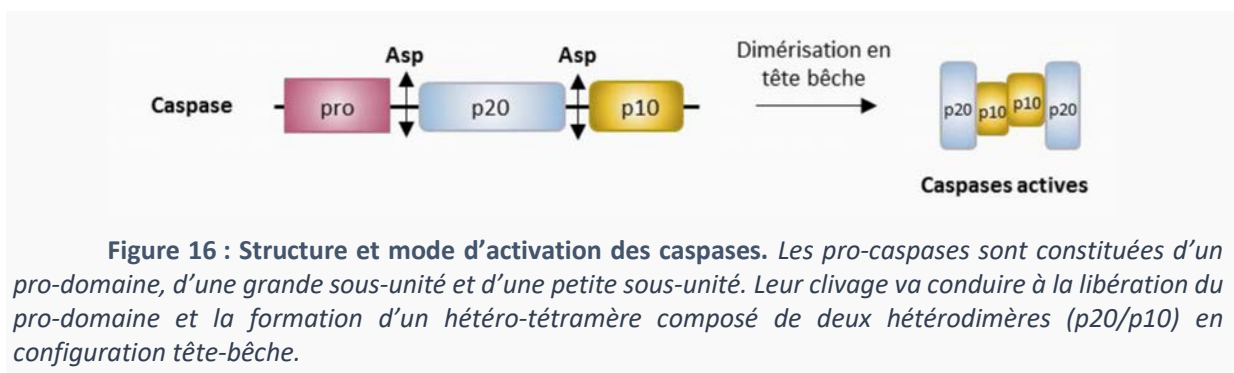


Figure 16 : Structure et mode d'activation des caspases. Les pro-caspases sont constituées d'un pro-domaine, d'une grande sous-unité et d'une petite sous-unité. Leur clivage va conduire à la libération du pro-domaine et la formation d'un hétéro-tétramère composé de deux hétérodimères (p20/p10) en configuration tête-bêche.

A.2.2. Action des caspases

Alors que les caspases initiatrices ont comme substrat les caspases effectrices, les caspases effectrices sont capables de cliver des centaines de substrats responsables, à terme, du démantèlement de la cellule. Les caspases vont reconnaître une séquence de 4 acides aminés notés S4-S3-S2-S1. Le clivage a lieu après le résidu S1 qui est généralement un résidu d'acide aspartique (D), soit un motif XXXD. Plusieurs études ont tenté de trouver des térapeptides préférentiels en fonction des caspases (Stennicke et al., 2000; Talanian et al., 1997; Thornberry et al., 1997). Ainsi, les caspases 1, 4 et 5 reconnaissent préférentiellement le motif WEHD, les caspases 2, 3 et 7 le motif DEXD et les caspases 6, 8, 9 et 11 le motif (L/V)EXD. De manière intéressante, certaines caspases possédant un long pro-domaine, semblent avoir plus d'affinité pour des térapeptides qui ressemblent à leur propre site de clivage. Ceci suggère que ces caspases pourraient s'autoactiver.

Aujourd'hui plus de 1500 substrats des caspases ont été identifiés (Julien and Wells, 2017). Parmi eux, on retrouve de nombreuses protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité du cytosquelette et du noyau, comme l'actine et la lamine B, qui vont expliquer la condensation nucléaire ainsi que le changement de morphologie des cellules apoptotiques. On distingue également des protéines responsables de la transcription ou la réparation de l'ADN, tel que la PARP (*poly(ADP-ribose) polymérase*). En effet, la PARP est une protéine nucléaire abondante qui est recrutée à la suite d'altérations de l'ADN et qui participe au processus de réparation. Lors de l'apoptose, la PARP est clivée par les caspases 3 et 7 (Germain et al., 1999; Lazebnik et al., 1994). Enfin, certaines protéines de la signalisation et des protéines impliquées dans le cycle cellulaire sont également des cibles des caspases et abrogent ainsi les voies de survie cellulaire (Earnshaw et al., 1999; Fischer et al., 2003; Nicholson, 1999).

B – Les voies d'induction de l'apoptose

Il existe deux voies principales de l'induction de l'apoptose : la voie extrinsèque, médiée par les récepteurs de mort avec comme complexe activateur les caspases 8 et 10, et la voie intrinsèque, médiée par les mitochondries et la formation de l'apoptosome impliquant la caspase 9. Les deux voies auront pour conséquence d'activer les caspases effectrices de l'apoptose.

B.1. La voie extrinsèque : L'apoptose par les récepteurs membranaires

La voie extrinsèque est initiée par des perturbations au niveau de l'environnement extracellulaire qui vont être détectées par la cellule par le biais des récepteurs membranaires. Ceux-ci sont majoritairement des récepteurs appartenant à la famille des récepteurs de mort, mais d'autres

récepteurs, comme les récepteurs à dépendance, peuvent également activer cette voie. Les récepteurs de mort, dont les plus connus sont les récepteurs Fas (*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*) (aussi appelé CD95 (*cluster of differentiation 95*) ou APO1 (*apoptosis antigen 1*)) et les récepteurs au TNF (*tumor necrosis factor*) vont s'activer en réponse à un ligand. Leur activation va conduire à la formation d'un complexe multi-protéique au niveau intracellulaire, appelé le complexe DISC (*death-inducing signalling complex*), qui va permettre de recruter et d'activer les caspases initiatrices 8 et 10 (Boldin et al., 1996; Dickens et al., 2012; Muzio et al., 1996). Dans le cas de Fas, le ligand va induire un changement de conformation du récepteur de mort, au niveau de sa partie intracellulaire, rendant accessible le death domain (DD) à des protéines adaptatrices comme FADD (*Fas associated via death domain*) possédant eux aussi un domaine DD. Puis FADD va recruter la pro-caspase 8 (ou 10) via son domaine DED (*death effector domain*) (Krammer, 2000) (Figure 17). Le récepteur TNF ne va pas recruter directement FADD mais par l'intermédiaire d'une autre protéine adaptatrice TRADD qui possède aussi un domaine DD (Galluzzi et al., 2018; Micheau and Tschopp, 2003).

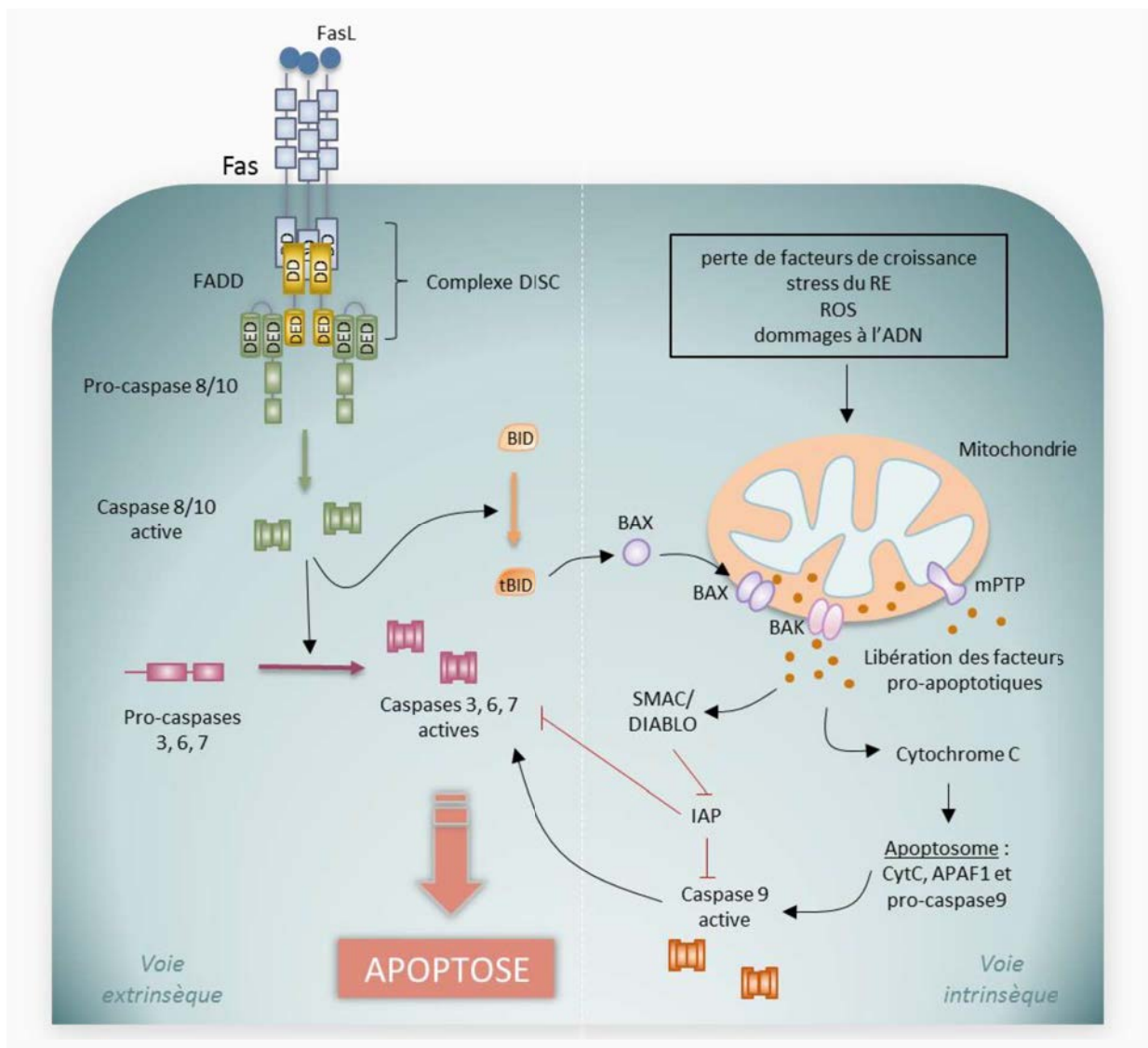


Figure 17 : Schéma des deux voies d'induction de l'apoptose. La voie extrinsèque est activée par des récepteurs de mort comme Fas exprimés à la surface des cellules. A la suite de leur liaison avec leur ligand ces récepteurs vont recruter le complexe DISC responsable de l'activation des caspases initiatrices (8,10). Ces caspases vont ensuite activer les caspases effectrices (3, 6, 7) et provoquer la mort de la cellule par apoptose. La voie intrinsèque est activée par divers stimuli (absence de facteurs de croissance, des dommages à l'ADN...) qui vont conduire à la perméabilisation des membranes mitochondriales. Cette perméabilisation peut s'expliquer par la formation de pores à travers les membranes via l'oligomérisation des protéines BAX et BAK ou par l'ouverture du mPTP. Ainsi, la mitochondrie va libérer de nombreux facteurs pro-apoptotiques tel que le cytochrome C ou SMAC/DIABLO initialement stockés dans l'IMS (espace intramembranaire). Le cytochrome C va participer à la formation de l'apoptosome avec APAF1 et la pro-caspase9 qui aura pour conséquence d'activer la caspase 9 qui activera à son tour les caspases effectrices. Les facteurs SMAC-DIABLO vont quant à eux inhiber les inhibiteurs des caspases (IAP). D'autre part, ces deux voies sont intimement liées car l'activation des caspases initiatrices 8 et 10 va provoquer le clivage de BID en tBID actif favorisant ainsi la translocation de BAX à la membrane mitochondriale et l'activation de la voie intrinsèque.

B.2. La voie intrinsèque : l'apoptose par la mitochondrie

La voie intrinsèque de l'apoptose est initiée par une grande variété de stimuli comme les perturbations au niveau de l'environnement extracellulaire (perte de facteurs de croissance etc.), le stress du RE (*réticulum endoplasmique*), l'accumulation de ROS (*reactive oxygen species*), les dommages à l'ADN ou encore les anomalies mitotiques. L'initiation de l'apoptose par la voie intrinsèque devient irréversible lorsque celle-ci provoque la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*), qui va être contrôlée par les protéines membres de la famille BCL2 (Tait and Green, 2010) (Figure 17).

B.2.1 Structure et fonctions des mitochondries

Les mitochondries sont des organelles intracellulaires essentielles pour la respiration cellulaire et pour la production d'énergie sous forme d'ATP. En effet, plusieurs réactions ont lieu au cœur des mitochondries comme le cycle de Krebs, la phosphorylation oxydative par la chaîne respiratoire, ou encore la β -oxydation des acides gras. Elles ont la particularité d'être des organites semi-autonomes car elles possèdent leur propre génome et quelques protéines y sont directement synthétisées. A la fin des années 90, il a été montré qu'elles jouaient également un rôle crucial dans l'induction de l'apoptose (Liu et al., 1996; Zamzami et al., 1995). Les mitochondries sont présentes dans la plupart des types cellulaires eucaryotes et leur nombre au sein d'une cellule va varier en fonction du type cellulaire et des besoins en énergie. Alors que leur taille et leur forme peuvent évoluer en fonction de l'activité de la cellule, leur structure reste identique. Les mitochondries sont composées de deux

membranes, la membrane externe mitochondriale (OMM, *outer mitochondrial membrane*) et la membrane interne mitochondriale (IMM, *inner mitochondrial membrane*) qui délimitent 2 espaces : l'espace inter-membranaire (IMS, *inter-membrane space*) et la matrice (Figure 18). La membrane interne a la particularité de former de nombreuses invaginations vers la matrice afin d'augmenter la surface d'échange qui sont appelées les crêtes mitochondriales (Hackenbrock, 1966; Palade, 1952; Sjöstrand, 1953).

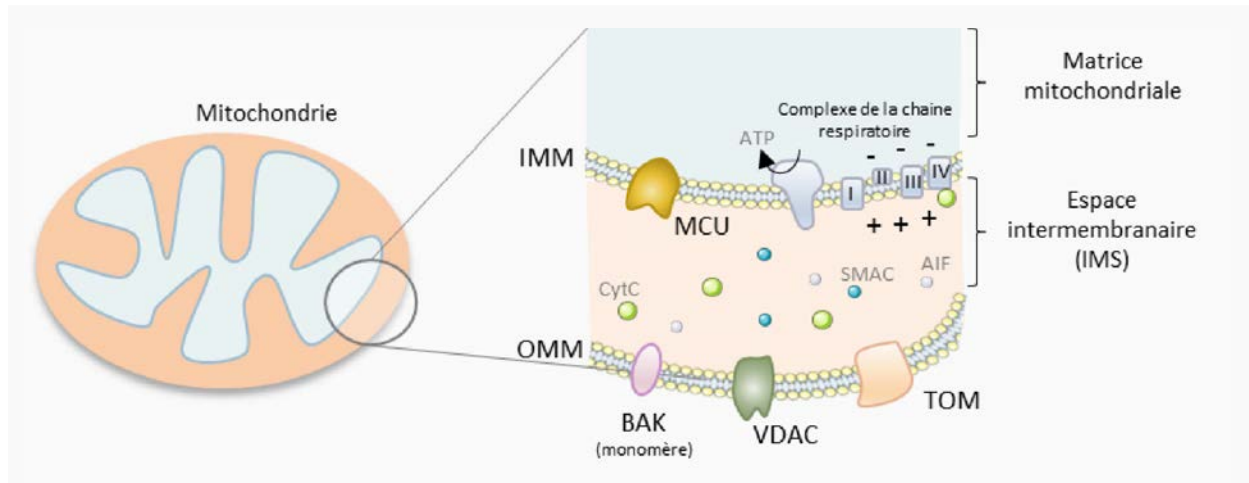


Figure 18 : Structure de la mitochondrie. Les mitochondries sont composées de deux membranes, l'OMM (membrane externe mitochondriale) et l'IMM (membrane interne mitochondriale) délimitant deux espaces qui sont la matrice et l'IMS (espace intermembranaire). L'OMM se caractérise par sa perméabilité aux molécules inférieures à 10 kDa due à l'expression des canaux VDAC. On retrouve aussi sur cette membrane des translocases comme TOM ou des protéines impliquées dans l'apoptose comme BAK. Contrairement à l'OMM, l'IMM est imperméable ce qui permet de créer une différence de potentiel entre la matrice et l'IMS nécessaire à la production d'ATP. On y retrouve les différents complexes de la chaîne respiratoire, des canaux participant au trafic des ions dans la mitochondrie, etc. Enfin, la composition de l'IMS est relativement semblable au cytosol. Toutefois, de nombreux facteurs pro-apoptotiques y sont enfermés tel que le cytochrome C, SMAC/DIABLO ou les AIF.

L'OMM se caractérise par sa grande perméabilité aux molécules d'une masse inférieure à 10 kDa et aux ions. Cette perméabilité est attribuée à la forte expression d'un canal appelé VDAC (*voltage dependant anion channel*) qui forme des pores au travers de la membrane externe. Cette protéine va également, on le verra plus tard, servir de point d'ancrage à d'autres protéines en dehors de la mitochondrie. Les molécules de tailles supérieures vont pouvoir passer l'OMM via un transport actif par les translocases (TOM, *translocase of the outer membrane*).

L'IMM, contrairement à l'OMM, est imperméable aux ions, probablement parce qu'elle est composée à 20% de cardiolipine. Cette imperméabilité est indispensable pour le bon fonctionnement de la chaîne respiratoire, dont les différents complexes sont portés par l'IMM, et au maintien d'un

gradient électrochimique entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. En effet, les complexes de la chaîne respiratoire vont pomper des protons à travers l'IMM créant ainsi le gradient électrochimique dont l'énergie va être utilisée par la F1/F0-ATPase synthase afin de phosphoryler l'ADP en ATP (Nicholls, 2002). Enfin, du fait de son imperméabilité, l'IMM exprime de nombreux canaux responsables de la circulation des ions dans la mitochondrie tel que le canal MCU (*mitochondrial calcium channel uniporter*) spécifique de l'ion calcium (Figure 18) ou des transporteurs comme le canal ANT (*adenine nucleotide translocase*) responsable de l'entrée d'ADP dans la matrice mitochondriale et de la sortie d'ATP (Baughman et al., 2011; Pfaff and Klingenberg, 1968).

La matrice mitochondriale enferme un grand nombre d'enzymes nécessaires aux différentes réactions métaboliques. On y retrouve également le génome mitochondrial (mtDNA) qui code pour 37 gènes chez l'Homme dont certains conduisent à l'expression de protéines participant à la formation de la chaîne respiratoire.

La composition de l'IMS va être assez semblable au cytosol en ce qui concerne les petites molécules s'expliquant par la perméabilité de l'OMM. Toutefois, on va retrouver un certain nombre de protéines spécifiques de cet espace comme le cytochrome C, une protéine qui participe au bon fonctionnement de la chaîne respiratoire mais aussi au processus apoptotique si elle est libérée dans le cytosol, ou encore les protéines SMAC/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*) ou AIF (*apoptosis-inducing fragment*) qui sont d'autres protéines pro-apoptotiques (Figure 18).

B.2.2. La perméabilisation de la membrane mitochondriale

La voie intrinsèque de l'apoptose se caractérise par la perméabilisation de l'OMM responsable de la libération dans le cytosol des protéines pro-apoptotiques. Cette étape de perméabilisation est considérée comme le point de non-retour au processus apoptotique (Tait and Green, 2010). Elle va être strictement contrôlée par des protéines pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques de la famille BCL-2. L'action des différents membres de la famille BCL-2 dans l'apoptose sera abordée dans le paragraphe C.2. Suite à un stimulus apoptotique, les protéines BAK et BAX vont former un pore à travers l'OMM (Czabotar et al., 2014). Alors que BAK est connue pour être localisée au niveau de la mitochondrie de manière basale, BAX se trouve dans le cytosol. Il s'avère que BAX effectue des allers-retours de l'OMM vers le cytosol, probablement à cause d'interactions avec des protéines anti-apoptotiques cytosoliques comme BCL-XL qui d'empêchent son action apoptotique (Edlich et al., 2011; Todt et al., 2013; Wolter et al., 1997). A la suite de signaux cytotoxiques, BAX va s'accumuler au niveau des mitochondries. Il est couramment admis qu'une fois activées, BAX et BAK forment des homodimères (voire des

hétérodimères) afin de former des pores membranaires (Suzuki et al., 2000) (Figure 17). Toutefois, ce postulat est controversé puisque certains appuient la théorie que BAX et BAX vont participer à la formation d'un pore lipidique en déstabilisant la membrane (Qian et al., 2008). Dans tous les cas la conséquence fonctionnelle sera la libération des facteurs pro-apoptotiques contenus dans l'IMS.

L'autre mécanisme pouvant provoquer la perméabilisation de la mitochondrie est l'ouverture d'un pore de perméabilité transitoire appelé le mPTP (*mitochondrial permeability transition pore*), décrit pour la première fois en 1979 (Hunter and Haworth, 1979). Le mPTP est un complexe multiprotéique formant un pore non sélectif reliant les deux membranes mitochondriales. Une ouverture prolongée du pore entraîne la fuite du calcium mitochondrial et la chute de son potentiel membranaire ce qui provoque un choc osmotique responsable de la rupture des membranes mitochondriales. Ainsi, l'ouverture du mPTP est associée au relargage du contenu mitochondrial conduisant à l'amplification de l'apoptose comme décrit précédemment (Bernardi, 1999). La composition de ce pore n'est pas encore clairement élucidée et surtout sujet à controverse. Le tout premier modèle suggère que le mPTP est composé du canal VDAC au niveau de l'OMM et du canal ANT au niveau de l'IMM (Halestrap and Davidson, 1990; Szabó and Zoratti, 1993). Depuis, d'autres protéines se sont ajoutées à ce modèle comme la cyclophilin D, l'hésokinase II, la GSK3, une partie de l'ATP synthase ou encore certains membres de la famille BCL2 (Baines et al., 2005; Beutner et al., 1998; Bonora et al., 2013; Kroemer et al., 2007). Les mécanismes permettant son ouverture sont encore très incertains, toutefois, il semblerait que l'un des éléments déclencheurs soit le calcium car des études ont montré qu'une surcharge calcique au sein de la mitochondrie pouvait induire l'ouverture de ce pore (Baumgartner et al., 2009; Hunter and Haworth, 1979; Giorgi et al., 2012). Cette surcharge peut être due à un relargage important de calcium depuis le RE qui va être recapté par les mitochondries.

B.2.3. Les facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie

Le cytochrome C (CytC), libéré de l'IMS suite à la perméabilisation de la mitochondrie, est un élément indispensable à l'induction de l'apoptose par la voie intrinsèque. Une fois dans le cytosol, le cytochrome C va se fixer sur le motif WD40 de la protéine Apaf1 (*apoptotic protease activating factor 1*) provoquant un changement de conformation de la protéine qui dévoile alors son domaine CARD (*caspase recruitment domain*). Puis, une molécule d'ATP va se fixer sur le complexe Apaf1/CytC afin de stabiliser cette nouvelle conformation et permettre l'oligomérisation de sept unités apaf1/CytC/ATP. Ce nouvel heptamère va recruter les pro-caspases 9 *via* une interaction entre les domaines CARD de Apaf1 et de la pro-caspase 9. Du fait de leur proximité, les pro-caspases 9 vont s'auto-activer par

clivage. Ce complexe multi-protéique, désormais actif est appelé l'apoptosome permettant d'activer les caspases effectrices par clivage (Riedl and Salvesen, 2007).

Parmi les autres facteurs relargués par la mitochondrie au cours de l'activation de la voie intrinsèque se trouvent les protéines SMAC/DIABLO (Figure 17). Ces protéines sont des inhibiteurs des IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*), elles-mêmes inhibitrices des caspases. Ces dernières vont se lier au niveau du domaine BIR des IAPs afin d'empêcher leur liaison avec les caspases et supprimer leur action anti-apoptotique. On retrouve également les facteurs AIF et l'endonucléase G qui, une fois libérés dans le cytosol, vont migrer vers le noyau et induire une condensation de la chromatine ainsi qu'un clivage de l'ADN (Daugas et al., 2000; Deveraux et al., 1997; Du et al., 2000; Li et al., 2001; Verhagen et al., 2000).

C – Le contrôle de l'induction de l'apoptose

C.1. Régulation de l'activation des caspases

Dans la cellule, l'activation ou l'inactivation des caspases sont contrôlées par différents mécanismes. Tout d'abord, il y a les membres de la famille des IAPs qui sont fortement conservés chez les mammifères et exprimés dans de nombreux tissus (Deveraux and Reed, 1999). Tous les membres de cette famille possèdent un domaine BIR (*baculovirus IAP repeat*) en N-terminal, présent en 1 à 3 copies. Le ou les domaines BIR vont être impliqués dans l'interaction des IAPs avec les caspases et ont pour conséquence d'inhiber l'activité catalytique des caspases. Toutefois, tous les membres des IAPs ne sont pas des inhibiteurs de caspases ou de l'apoptose. Certains membres ont, en plus des domaines BIR, un domaine RING en C-terminal leur permettant d'agir comme des E3-ubiquitine ligases favorisant la dégradation des caspases (Dueber et al., 2011; Nakatani et al., 2013). Parmi elles, les protéines XIAP, c-IAP1, c-IAP2 et la survivin ont été identifiées comme étant des inhibiteurs de caspases capables de se lier directement aux caspases 3, 7 et 9 (Deveraux et al., 1997, 1998; Roy et al., 1997; Tamm et al., 1998). Dans le cas de XIAP, le domaine BIR3 va se lier avec la sous-unité p10 de la caspase 9 tandis que c'est le domaine BIR2 qui va être capable d'interagir avec le site actif des caspases 3 et 7 (Scott et al., 2005; Shiozaki et al., 2003; Takahashi et al., 1998).

Il existe d'autres inhibiteurs des caspases comme les FLIP (*Fas-associated death domain protein*). Par exemple, les FLIPs sont des homologues des caspases mais inactifs ; ils possèdent deux domaines DED et sont structurellement très similaires à la partie N-terminale de la pro-caspase 8. Ces domaines vont leur permettre de se lier aux molécules adaptatrices recrutées par les récepteurs de

mort empêchant ainsi leur interaction avec la caspase 8 et son activation (Golks et al., 2005; Krueger et al., 2001).

De manière opposée, il existe aussi des activateurs de caspases comme les calpaines. Les calpaines possèdent de nombreux substrats en commun avec la caspase 3, tel que la PARP, et il semble qu'elles soient également capables de cliver la pro-caspase 3 en caspase 3 active (Blomgren et al., 2001). Il a été montré qu'elles jouaient un rôle important dans l'apoptose induite par un stress du RE en raison de la perturbation de l'homéostasie calcique (Wang, 2000).

C.2. Le rôle de la famille BCL-2

C.2.1. Caractéristiques des membres de la famille BCL-2

Les protéines de la famille BCL-2 jouent un rôle crucial dans la régulation de l'apoptose. Alors que certaines protéines vont favoriser l'apoptose d'autres vont, à l'inverse, inhiber le processus. La protéine BCL-2, dont le nom est à l'origine de la dénomination de la famille, a été initialement découverte comme un oncogène impliqué dans un lymphome diffus à grandes cellules B chez l'Homme (*follicular B cell lymphomas, BCL*) (Tsujiimoto and Croce, 1986). Ce n'est que plus tard que l'activité anti-apoptotique de BCL-2 a été identifiée et qu'un grand nombre de protéines possédant des homologies de séquence ont été isolées et forment aujourd'hui la famille des protéines BCL-2 (Adams and Cory, 1998; Tsujiimoto, 1989; Vaux et al., 1988).

Les membres de cette famille se caractérisent par la présence d'au moins un domaine BH (*BCL-2 homology*) d'une vingtaine d'acides aminés environ. Au total, il existe 4 domaines BH (BH1, BH2, BH3 et BH4), numérotés en fonction de leur date de découverte. Ces domaines partagent une certaine homologie de séquence qui est importante pour les interactions entre les membres de la famille BCL-2 (Aouacheria et al., 2013; Chittenden et al., 1995). La présence ou l'absence de certains de ces domaines ainsi que la fonction des protéines BCL-2 ont permis de les classer en 3 catégories : (i) les protéines anti-apoptotiques tel que BCL-2, Bcl-XL, ou MCL-1 qui ont la particularité de posséder les 4 domaines BH; (ii) les protéines pro-apoptotiques tel que BAX et BAK qui expriment les domaines BH1, BH2 et BH3 mais pas BH4 ; (iii) et enfin les protéines « BH3-only » tel que BID, BAD ou NOXA qui sont également des protéines pro-apoptotiques mais qui expriment uniquement le domaine BH3. Le domaine BH3 est crucial aux interactions protéines-protéines et est conservé pour tous les membres de la famille BCL-2.

C.2.2. Les protéines anti-apoptotiques

Parmi les protéines anti-apoptotiques on retrouve les protéines, BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W, BCL-B ou encore BFL-1. Au début des années 90 de nombreuses équipes ont montré que la surexpression de BCL-2 était associée à une inhibition de l'apoptose dans divers types cellulaires (Nuñez et al., 1990; Sentman et al., 1991; Strasser et al., 1991; Tsujimoto, 1989). Les protéines anti-apoptotiques vont prévenir la perméabilisation mitochondriale en séquestrant les protéines pro-apoptotiques. Pour ce faire, elles vont soit se fixer sur le domaine BH3 des protéines BH3-only afin de les inhiber, soit séquestrer directement les protéines pro-apoptotiques « effectrices » que sont BAX et BAK (Cheng et al., 2001; Llambi et al., 2011) (Figure 19). Des analyses de la structure de BCL-2 et BCL-XL ont montré que les domaines BH1, BH2 et BH3 étaient très proches et formaient une structure ressemblant à une poche hydrophobique (Muchmore et al., 1996). Cette poche est très probablement impliquée dans les interactions avec les autres membres de la famille BCL-2. La première preuve de ces interactions a été apportée en 1993 en identifiant BAX suite à une immunoprécipitation de BCL-2 (Oltvai et al., 1993). Depuis d'autres études ont étudié les diverses interactions entre les protéines pro- et anti-apoptotiques. Ainsi, dans le cas de BAK, son activation est empêchée par les protéines BCL-XL et MCL-1 mais pas BCL-2 (Sattler et al., 1997; Willis et al., 2005). Ce n'est qu'une fois activée que BAK semble pouvoir interagir avec BCL-2 (Cheng et al., 2001). De la même manière, l'activation de BAX est inhibée par les protéines BCL-2 et BCL-XL (Edlich et al., 2011; Gross et al., 1998; Oltvai et al., 1993; Simonian et al., 1996).

Il est à noter que l'échappement à l'apoptose est l'une des caractéristiques d'une cellule cancéreuse (Hanahan and Weinberg, 2011). De façon cohérente, bon nombre de protéines anti-apoptotiques sont surexprimées dans une grande variété de tumeurs comme le démontre la découverte de BCL-2 (Tsujimoto and Croce, 1986). Ainsi, des stratégies d'inhibition de ces protéines sont en cours de développement dans un but thérapeutique. Ce sont de petites molécules, appelées BH3 mimetics, qui vont se lier et inhiber les protéines anti-apoptotiques (Oltersdorf et al., 2005; Tse et al., 2008). Parmi elles, le Venetoclax, un inhibiteur de la protéine BCL-2, vient d'être approuvé par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*FDA, food and drug administration*) pour traiter certains cas de leucémie lymphoïde chronique (Roberts et al., 2016).

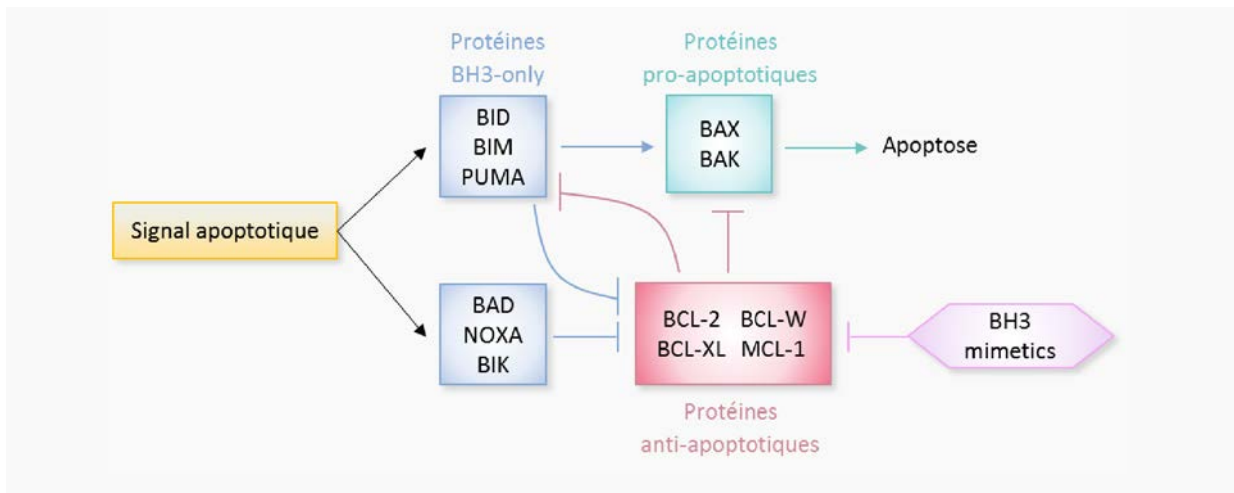


Figure 19 : Vue d'ensemble des interactions entre les différents membres de la famille BCL-2. A la suite d'un signal apoptotique, les protéines BH3-only vont s'activer et activer à leur tour les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK ou inhiber les protéines anti-apoptotiques. L'inhibition des protéines anti-apoptotiques peut être reproduite via l'utilisation de molécules pharmacologiques appelées BH3 mimétiques. L'activation des protéines BAX et BAK va conduire à la perméabilisation mitochondriale puis à l'apoptose. Les molécules anti-apoptotiques peuvent, quant à elles, inhiber les protéines BH3-only ou directement BAX et BAK afin de bloquer la cascade apoptotique.

C.2.3 Les protéines pro-apoptotiques

Les protéines pro-apoptotiques les mieux décrites sont les protéines BAX et BAK qui sont considérées comme primordiales à l'induction de l'apoptose. En effet, des MEFs présentant une double extinction des gènes *Bax/Bak* sont résistantes à l'apoptose induite par de nombreux signaux (Wei et al., 2001). En conditions normales, BAX et BAK sont présentes dans la cellule sous forme de monomère inactif (Wolter et al., 1997). Comme pour les protéines BCL-2 et BCL-XL, les domaines BH1, BH2 et BH3 de BAX et BAK forment une poche hydrophobique à l'intérieur de laquelle une protéine BH3-only peut se loger. En réponse à un signal de mort, et probablement suite à son activation par un BH3-only, les monomères de BAX se transloquent à la membrane mitochondriale où ils vont s'ancrer et former des homodimères. De la même manière, la protéine BH3-only BID induit une oligomérisation de BAK (Wei et al., 2000).

Le groupe des protéines BH3-only est constitué de diverses protéines comme BID, BIM, BIK, BAD, NOXA ou encore PUMA. Leur expression dans des cellules déficientes en BAK et BAX ne permet pas d'induire l'apoptose dans ces cellules. Ces résultats indiquent que la présence de BAK et BAX est nécessaire pour que les BH3-only puissent induire l'apoptose (Cheng et al., 2001; Zong et al., 2001). Plusieurs études ont démontré que toutes les protéines BH3-only étaient capables d'agir sur les protéines BCL-2 anti-apoptotiques et que certaines, comme BID, BIM et PUMA, pouvaient également

agir directement sur les protéines BAX et BAK (Chen et al., 2005; Kuwana et al., 2005; Letai et al., 2002) (Figure 19). Elles peuvent alors être séparées en deux groupes distincts : les BH3-only « sensibilisateurs » et les « activateurs ». Les sensibilisateurs initient l'apoptose en se liant aux protéines anti-apoptotiques afin de provoquer la libération de leurs partenaires pro-apoptotiques BAX et BAK (Chen et al., 2005). Par exemple, il a été montré que l'association de NOXA avec MCL-1 déclenchait sa dégradation et ainsi la libération de BAK (Willis et al., 2005). Afin d'activer BAX et BAK, les protéines BH3-only « activateurs » provoquent un changement de leur conformation favorisant leur dimérisation et dans le cas de BAX son intégration dans l'OMM (Eskes et al., 2000; Wei et al., 2000). Au sein des BH3-only, la protéine BID est un peu particulière. Présente dans le cytosol sous forme inactive, elle va être clivée par la caspase 8 en une forme active appelée tBID (*truncated BID*) qui va se transloquer à la mitochondrie. Cette forme tronquée est capable de se lier à la fois à BCL-2 pour l'inhiber et à BAX pour l'activer (Wang et al., 1996; Wei et al., 2000). Des mutations expérimentales du domaine BH3 de BID inhibent ses fonctions pro-apoptotiques et il devient incapable d'interagir avec BCL-2 ou BAX/BAK. D'autres résultats montrent que l'activité des protéines BH3-only peut être contrôlée par des modifications post-traductionnelles. En présence de facteur de croissance, BAD est présente dans le cytosol sous une forme inactive suite à sa phosphorylation par différentes kinases. Un stress induit par la diminution voire l'absence de facteur de croissance va conduire à l'accumulation de BAD non phosphorylé qui est libre d'interagir avec les protéines anti-apoptotiques et de bloquer leur action (Zha et al., 1996). Les protéines BH3-only peuvent aussi être régulées au niveau transcriptionnel car il a été montré que l'expression des protéines NOXA et PUMA augmente suite à des dommages à l'ADN (Nakano and Vousden, 2001; Oda et al., 2000).

En résumé, les différents membres de la famille BCL-2 s'engagent dans des interactions complexes les uns avec les autres en formant des homo- ou hétérodimères afin de réguler les processus d'apoptose. C'est d'ailleurs l'hétéro-dimérisation d'une protéine anti-apoptotique avec une protéine pro-apoptotique qui va inhiber leur activité respective (Wang et al., 1998). D'autre part, une grande partie de ces protéines possède un domaine transmembranaire nécessaire à leur fonction. Alors que certaines sont constitutivement liées à une membrane intracellulaire d'autres sont cytosoliques et vont s'ancrer à une membrane en réponse à un stimulus apoptotique (Edlich et al., 2011; Todt et al., 2013).

C.3. Echanges calciques et apoptose : l'implication des MAMs

Le calcium (Ca^{2+}), dont le principal stock est situé dans le RE, est un messenger intracellulaire très important. Par exemple, son transfert du RE vers les mitochondries va être nécessaire pour le bon

fonctionnement de nombreuses réactions métaboliques. Au sein de la cellule, il existe des zones appelées les MAMs (*mitochondrial associated ER membrane*) où ces deux organites sont étroitement accolés en contact facilitant ainsi le transfert de Ca^{2+} .

C.3.1. Les MAMs

C'est en 1959 qu'a été proposé pour la première fois que le RE puisse interagir directement avec les mitochondries (Copeland and Dalton, 1959). Depuis, des études complémentaires associant fractionnement subcellulaire et microscopie ont confirmé l'existence d'une association entre les deux organites réduisant leur distance à moins de 30 nm (Csordás et al., 2006; Franke and Kartenbeck, 1971; Meier et al., 1981; Pickett et al., 1980). Il est estimé que dans les cellules HeLa 20% du réseau mitochondrial se trouve juxtaposé au RE (Rizzuto et al., 1998). Cette zone de proximité entre la membrane du RE et la membrane externe mitochondriale est aujourd'hui couramment appelée MAMs (*mitochondrial associated ER membrane*). Les MAMs sont des structures dynamiques sensibles aux conditions physiologiques de la cellule qui permettent aux protéines situées à la surface du RE d'interagir avec les protéines de l'OMM. Au sein de cette interface on retrouve un enrichissement de protéines spécifiques du RE comme la calnexine, la FACL4 (*fatty acid-CoA ligase 4*) et l'IP3R (*inositol-1,4,5-tris-phosphate receptor*), des protéines spécifiques des mitochondries comme VDAC ou ANT mais également des protéines impliquées dans le stress du RE, les échanges calciques, la synthèse lipidique, etc. La diversité des protéines et lipides composant les MAMs témoignent de leur rôle dans de nombreux processus cellulaires.

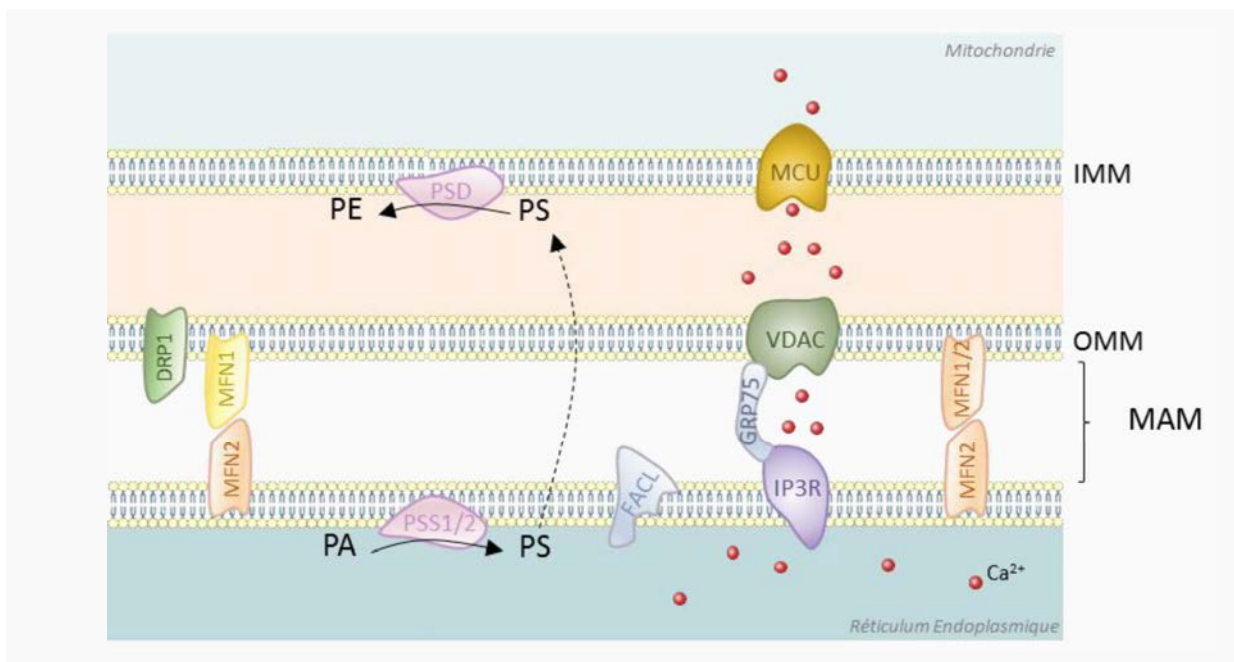


Figure 20 : Les protéines situées à la jonction RE-mitochondries. Les MAMs caractérisent les membranes et l'espace où le RE est juxtaposé aux mitochondries. De ce fait on retrouve à cette interface plusieurs protéines spécifiques du RE comme *FACL4*, *PSS1/2* ou encore *IP3R* ou des protéines spécifiques des mitochondries tel que *VDAC* ou le *MCU*. Les protéines *IP3R* et *VDAC* sont fortement exprimées au niveau des MAMs et participent activement aux échanges calciques entre les deux organites. Leur rapprochement est assuré par la protéine chaperonne *GRP75*. D'autre part, plusieurs protéines impliquées dans la synthèse lipidique sont concentrées au niveau des MAMs (*FACL4*, *PSS1/2*...). Par conséquent, le transport vers les mitochondries des lipides néo-synthétisés est facilité. Afin de maintenir ce rapprochement plusieurs protéines entrent en jeu dont les mitofusines exprimées à la surface du RE et des mitochondries qui vont interagir directement dans le but de sceller cette interface.

Initialement, les MAMs ont été caractérisées comme étant un haut lieu de synthèse lipidique car s'y trouvent de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme des lipides comme la *FACL4* ou la *PSS1/2* (*phosphatidylsérine synthase 1/2*). Cette particularité leur permet de favoriser les échanges de lipides entre le RE et les mitochondries. Par exemple, la synthèse de la phosphatidylsérine (PS) est favorisée au niveau des MAMs car elle nécessite l'action des *PSS1/2* qui sont des enzymes fortement exprimées dans cette zone. Ainsi son transport vers les mitochondries est facilité (Shiao et al., 1995; Vance, 1990) (Figure 20).

Le contact entre le RE et les mitochondries joue également un rôle dans la morphologie des mitochondries en contrôlant les phénomènes de fusion et fission. Les mitofusines 1 et 2 (*MFN1* et 2) sont des protéines à activité GTPase ancrées dans la membrane externe des mitochondries et qui tirent leur nom de leur rôle dans la fusion des mitochondries. En effet, elles vont permettre de rapprocher les mitochondries en formant des homo- ou hétérodimères de mitofusines (Chen et al., 2003). Il a été démontré que la protéine *MFN2* était également présente à la membrane du RE, plus précisément au niveau des MAMs, permettant ainsi la fixation du RE avec les mitochondries. Pour cela, la *MFN2* présente au niveau du RE va se dimériser avec la *MFN1* ou 2 de l'OMM pour faire le pont entre les deux organites (Figure 20). La perte d'expression de *MFN2* dans des fibroblastes embryonnaires ou dans des cellules HeLa a provoqué une augmentation de la distance RE-mitochondries, une altération de la morphologie des mitochondries ainsi qu'une réduction de l'absorption de calcium par la mitochondrie (de Brito and Scorrano, 2008). Une autre GTPase est impliquée dans les phénomènes de fusion/fission, la dynamin-related protéin1 (*DRP1*). Il semblerait que les mécanismes de recrutement de *DRP1* et la sélection du site de fission soit déterminés par les interactions RE-mitochondrie car il a été observé que le RE pouvait s'enrouler autour des mitochondries avant le recrutement de *DRP1* au niveau du futur site de fission (Friedman et al., 2011).

C.3.2. Echanges calciques au niveau des MAMs

Les MAMs sont le plus souvent décrites pour leur rôle capital sur la signalisation calcique. Ces échanges entre le RE et les mitochondries vont dépendre de la distance entre les deux organites et sont donc facilités au niveau des MAMs. Au niveau du RE, le calcium est relargué vers le milieu intracellulaire par les canaux IP3R. Ces canaux sont fortement exprimés au niveau des MAMs et créent des microdomaines très concentrés en calcium aux abords des mitochondries (Rizzuto et al., 1993) (Figure 20). Au niveau des mitochondries, deux protéines vont participer à l'entrée de calcium, la protéine VDAC située sur l'OMM et la protéine MCU (*mitochondrial calcium channel uniporter*) située sur l'IMM. Des protéines chaperonnes semblent impliquées dans le rapprochement des canaux IP3R et VDAC afin de favoriser les échanges de calcium. Par exemple, il a été montré que la GRP75 (*glucose-regulated protein 75*), permettait de lier physiquement VDAC à l'IP3R (Szabadkai et al., 2006) (Figure 20). Son rôle est crucial et plusieurs études démontrent que l'utilisation de siARN contre GRP75 réduit l'efficacité d'absorption de calcium par les mitochondries (Szabadkai et al., 2006).

Alors que le canal VDAC est très perméable aux solutés et aux ions, le canal MCU ne l'est pas et nécessite une concentration élevée en calcium pour s'ouvrir (Kirichok et al., 2004). En condition physiologique, la concentration calcique cytosolique n'est pas suffisante pour provoquer l'ouverture du canal MCU. D'où l'intérêt de l'existence de microdomaines fortement concentrés en calcium au niveau des MAMs, qui dépassent largement les concentrations enregistrées dans le cytosol, et qui sont compatibles avec l'ouverture du canal MCU (Csordás et al., 2010; Rizzuto et al., 1998). Ces échanges calciques sont nécessaires au bon fonctionnement du métabolisme mitochondrial mais également à l'induction de l'apoptose. En effet, compte tenu du rôle central du calcium dans la régulation de la mort cellulaire il ne serait pas surprenant que les canaux calciques participent aux décisions relatives au devenir cellulaire. De façon cohérente, des études ont montré que le KO de IP3R conférait aux cellules une résistance à l'apoptose (Jayaraman and Marks, 1997).

De manière physiologique, les mitochondries tamponnent la concentration de calcium intracellulaire. En effet, de petites oscillations de calcium favorisent le métabolisme aérobie et donc la production d'ATP par la mitochondrie en modulant l'activité des enzymes du cycle de Krebs (Cárdenas et al., 2010). A l'opposé, une surcharge calcique mitochondriale favorise l'apoptose en provoquant l'ouverture du mPTP (Rizzuto et al., 2012). Il se trouve que dans certains cas de stress, le ER est capable de relarguer une quantité importante de Ca^{2+} . Celui-ci va être recapté par la mitochondrie afin d'éviter une augmentation anormale de la concentration calcique cytosolique. Toutefois un trop fort taux de calcium dans la mitochondrie est toxique et conduit à la libération des facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol déclenchée par l'ouverture du mPTP. Les stimuli apoptotiques à l'origine de la vidange des

stocks calciques réticulaires peuvent être de nature physiologique (ROS, corticostéroïdes) ou pharmacologique (Cisplatine) (Naon and Scorrano, 2014). Ainsi, c'est la quantité de calcium relarguée par le RE et la durée du signal qui va influencer la réponse de la mitochondrie.

C.3.3. Implication des membres de la famille BCL-2

Au cours de la dernière décennie, des études ont démontré que des membres de la famille BCL-2 se trouvaient également au niveau des MAMs et qu'ils étaient capables de moduler les échanges calciques en faveur ou non de l'apoptose (Rong and Distelhorst, 2008). Ces résultats renforcent l'hypothèse de l'implication des MAMs dans l'induction de l'apoptose.

Concernant les membres anti-apoptotiques, BCL-2 et BCL-XL peuvent interagir de manière fonctionnelle avec le canal IP3R afin de moduler la sortie de calcium (Chen et al., 2004; Monaco et al., 2013). Une surexpression de BCL-2 dans des cellules HeLa induit une fuite de calcium du RE, non compatible avec l'ouverture du MCU, épuisant ainsi les réserves intracellulaires (Pinton et al., 2000). Cette conséquence pourrait faire partie des mécanismes par lesquels BCL-2 inhibe l'apoptose car elle minimise les quantités de calcium libérées suite à un stimulus apoptotique diminuant ainsi la quantité de calcium absorbée par les mitochondries et empêchant par conséquent l'ouverture du mPTP. Dans le cas de BCL-XL, il a été montré qu'il allait provoquer une sortie de calcium par vague, afin de former des oscillations de calcium propices au bon fonctionnement du métabolisme mitochondrial (Li et al., 2007). Il a alors une action pro-survie. En résumé, les protéines anti-apoptotiques se trouvent également au niveau des MAMs afin d'agir comme régulateurs des canaux IP3R, assurant ainsi la prolifération des cellules dépendantes du calcium tout en les protégeant de l'apoptose.

Inversement, les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK peuvent induire une fuite massive de calcium du RE afin d'induire une surcharge calcique mitochondriale et provoquer l'apoptose (Nutt et al., 2002). Leur rôle a d'abord été étudié dans des cellules MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) double KO pour BAX et BAK. Ces cellules sont résistantes à l'apoptose et présentent un faible taux de calcium dans les réserves réticulaires s'expliquant par une fuite continue de calcium (Scorrano et al., 2003). Cette fuite est principalement due à l'action de BCL-2 sur les IP3R qui n'est plus contrée ni par BAX ni par BAK. En effet, l'utilisation d'un siARN contre BCL-2 ou IP3R restaure partiellement les stocks calciques dans ces cellules déficientes en BAX et BAK. Contrairement à BCL-2 ou BCL-XL, il n'a jamais été rapporté d'interaction directe de BAX ou BAK avec IP3R. Par conséquent, l'une des hypothèses est que leur action sur les flux calciques passe par la modulation des protéines anti-apoptotiques. Toutefois, des résultats récents démontrent que BAK faciliterait le transfert de calcium en favorisant

les contacts entre les mitochondries et la RE par la formation d'un complexe protéique formé de BIK, DAPK1 (*death-associated protein kinase1*), ERK et BAK (Mebratu et al., 2017).

Les protéines BH3-only jouent elles aussi un rôle actif dans la régulation des flux calcique entre le RE et les mitochondries. Par exemple, la protéine BIK va favoriser l'apoptose en induisant une sortie de calcium du RE BAX/BAK-dépendante (Mathai et al., 2005; Mebratu et al., 2017). En effet, BIK est capable de dissocier BAK et BCL-2 et d'enrichir la présence de BAK au niveau du RE. BIK peut également perturber l'interaction de BCL-2 avec l'IP3R. D'autre part, la protéine BID va plutôt promouvoir la reprise du calcium par la mitochondrie (Csordás et al., 2002). On peut également mentionner qu'une augmentation du calcium intracellulaire peut induire l'activation de BAD par sa déphosphorylation et va alors inhiber les protéines anti-apoptotiques (Jayaraman and Marks, 2000).

En conclusion, les interactions entre le RE et des mitochondries sont très importantes pour de nombreux processus cellulaires tels que le métabolisme des lipides, la dynamique mitochondriale ou encore l'apoptose. Divers complexes protéiques existent afin de garantir le maintien des MAMs. Parmi eux nous avons déjà évoqué les mitofusines et les canaux calciques *via* la Grp75. Les autres complexes pouvant être impliqués sont encore à clarifier. Par exemple, chez la levure un autre complexe multi-protéique appelé ERMES (ER-mitochondria encounter structure) a été décrit. Ce complexe ERMES est composé d'au moins deux protéines de l'OMM, MDM10 et MDM34 (mitochondrial distribution and morphology), d'une protéine cytosolique, MDM12, et d'une protéine située soit dans la membrane du RE ou l'OMM, MMM1 (mitochondrial morphology maintenance1).

D – Apoptose et cancer

La résistance à l'apoptose fait partie des principales caractéristiques acquises par une cellule cancéreuse car elle est cruciale au développement tumoral (Hanahan and Weinberg, 2011). En effet, l'apoptose permet, entre autres, d'éliminer les cellules dont le cycle cellulaire est perturbé, notamment à la suite de mutations oncogéniques. Une baisse d'induction de l'apoptose, favorise alors l'émergence de cellules pré-néoplasiques. Aujourd'hui, de nombreuses recherches démontrent que les tumeurs qui présentent une baisse de l'apoptose évoluent rapidement en tumeurs malignes résistantes aux thérapies conventionnelles (Cory and Adams, 2002; Johnstone et al., 2002).

D.1. Les mécanismes de résistance à l'apoptose

Un déséquilibre d'expression entre les protéines anti- et pro-apoptotiques peut rendre les cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose. En effet, dans les cellules cancéreuses, la surexpression

de protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 telles que BCL-2, BCL-XL et MCL-1 est fréquemment observée et est souvent associée à un mauvais pronostic avec une résistance aux radio- et chimiothérapies dans des cancers d'origines diverses (Indran et al., 2011; Kirkin et al., 2004). Par exemple, des translocations ou l'amplification du gène *BCL-2* ont été identifiées dans des cas de lymphomes et de CBNPC (Monni et al., 1997; Olejniczak et al., 2007). A l'opposé, des mutations susceptibles d'inhiber les capacités des membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2 ont également été retrouvées dans les cancers. Par exemple, des mutations décalant le cadre de lecture et des mutations inhibitrices au niveau des domaines BH de BAX ont été observées, respectivement, dans des cas de cancers du côlon et des cancers hématopoïétiques (Meijerink et al., 1998; Rampino et al., 1997). D'autre part, plusieurs études ont montré que les protéines BCL-2 pro-apoptotiques jouent un rôle très important dans l'efficacité des thérapies anticancéreuses. D'une part, le niveau d'expression de certaines protéines BH3-only, comme BIM et PUMA, sont prédictives d'une réponse à la chimiothérapie dans le cancer du côlon (Sinicrope et al., 2008). D'autre part, il semble que l'efficacité d'autres agents anti-cancéreux, comme les TKI, nécessitent la présence de ces protéines. Par exemple, dans les CBNPC mutés EGFR, l'activation de BIM est nécessaire pour induire la mort des cellules après traitement par un TKI anti-EGFR tel que le Gefitinib (Cragg et al., 2007; Gong et al., 2007).

Bien que les altérations associées à l'apoptose observées dans les cellules cancéreuses touchent le plus souvent les membres de la famille BCL-2 on retrouve aussi d'autres anomalies. L'expression et la fonction des protéines IAPs, qui sont des inhibiteurs des caspases, sont souvent dérégulées dans les cancers et sont également associées à un mauvais pronostic. Par exemple, une amplification génique de *clAP1* et *clAP2* est observée dans de nombreux types de cancers comme le cancer du foie, le CBNPC et le cancer du col de l'utérus (Dai et al., 2003; Imoto et al., 2002; Zender et al., 2006). A l'inverse, une baisse d'expression de SMAC/diablo, des inhibiteurs des IAPs, est observée dans les tumeurs de haut grade chez les patients atteints d'un cancer du rein et est corrélée avec une diminution de la survie sans récurrence (Kempkensteffen et al., 2008; Mizutani et al., 2005). Dans le cancer de la vessie, l'expression de SMAC/diablo est inversement corrélée avec le grade de la tumeur (Mizutani et al., 2010). D'autre part, une étude a montré que APAF-1, un des éléments clés pour la formation de l'apoptosome, était sous-exprimé dans de nombreux cas de mélanomes métastatiques. Cette sous expression peut s'expliquer par l'hyperméthylation du gène de *APAF-1* ou par une perte allélique englobant le locus de *APAF-1* (Soengas et al., 2001). Dans ces conditions l'apoptosome ne peut pas se former et les cellules sont incapables d'exécuter le processus d'apoptose intrinsèque décrit précédemment.

La protéine p53 peut également induire l'apoptose en favorisant l'expression de protéines pro-apoptotiques et de récepteurs de mort tels que Fas et en réprimant celles de protéines anti-

apoptotiques et des IAPs (Ryan et al., 2001). De manière cohérente, des mutations « perte de fonction » touchant le gène de *TP53* sont fréquemment observées dans les tumeurs humaines (Muller and Vousden, 2014).

Ainsi, différentes altérations permettent aux cellules cancéreuses de devenir résistantes à l'apoptose. Toutefois, la question de savoir si ces mutations sont des mutations drivers de l'oncogenèse ou si elles favorisent l'émergence de cellules déjà transformées reste controversée.

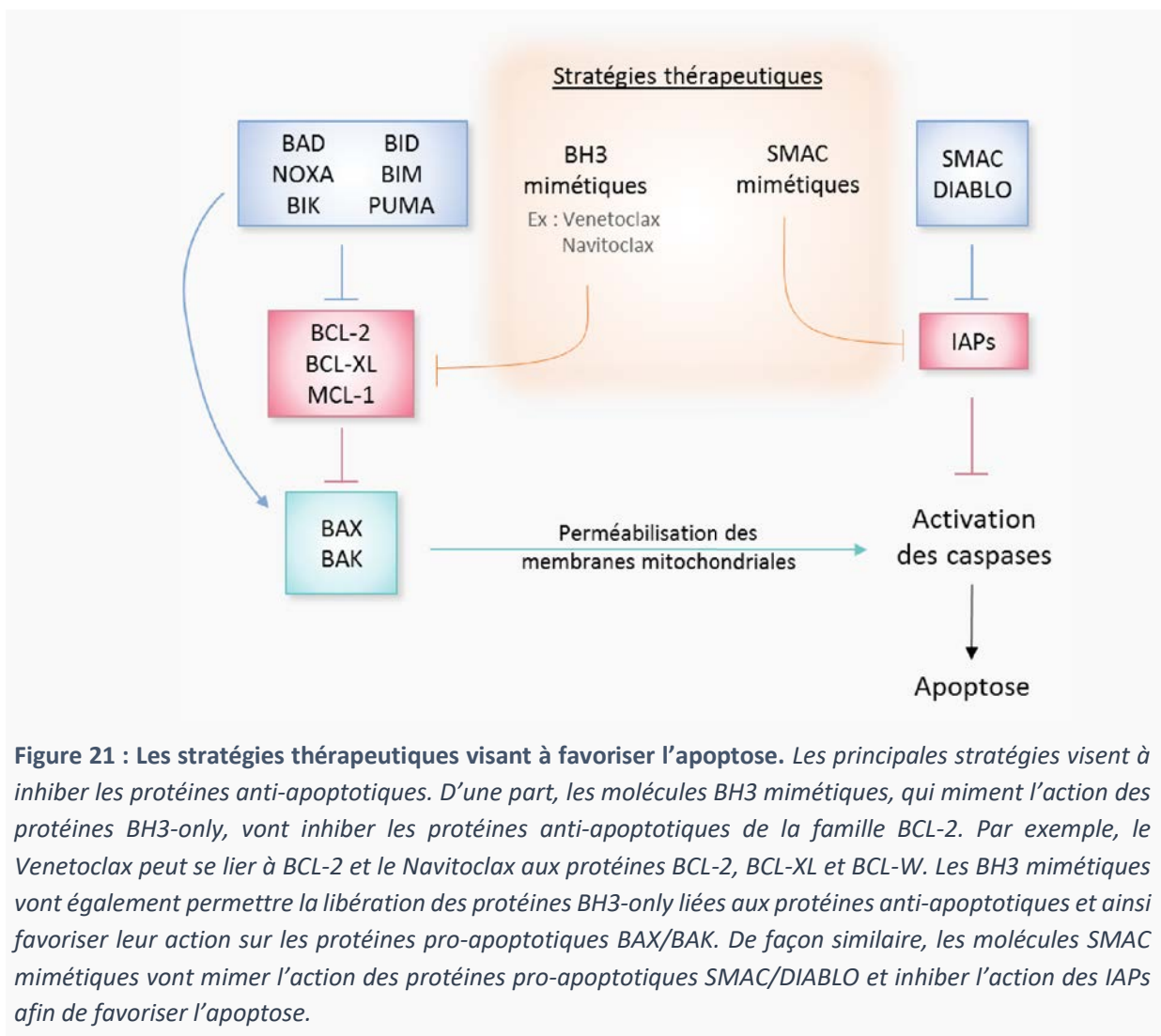
D.2. Stratégies thérapeutiques

Des études montrent que l'altération de l'expression des protéines de la famille BCL-2 est associée à des résistances à une vaste gamme d'agents cytotoxiques comme la radio- et la chimiothérapie dans des modèles de souris (Schmitt et al., 2000; Wei et al., 2001; Zhang et al., 2000). De plus, comme évoqué précédemment, il semble que les protéines pro-apoptotiques soient nécessaires pour induire la mort des cellules cancéreuses après un traitement par des agents anti-cancéreux. Ainsi, la re-sensibilisation des cellules cancéreuses à l'apoptose semble être une stratégie thérapeutique prometteuse pour surmonter les résistances aux traitements.

Par conséquent, l'inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 par l'utilisation de molécules qui miment l'action des protéines BH3-only, les BH3-mimétiques, est l'une des stratégies les plus prometteuses (Figure 21). Les molécules BH3-mimétiques vont interagir et bloquer l'action des protéines anti-apoptotiques BCL-2 afin de permettre l'activation de l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Lessene et al., 2008). Par exemple, le Navitoclax (ABT-737, ABT-263) est capable d'interagir avec BCL-2, BCL-XL et BCL-W. Des études sur des lignées cellulaires et des modèles animaux ont montré qu'il était capable de favoriser la mort des cellules en monothérapie dans des modèles de lymphomes et de cancers du poumon à petites cellules (CPPC), et en combinaison à la radio- ou chimiothérapie dans une grande variété de cancers (Ackler et al., 2010; Oakes et al., 2012; Oltersdorf et al., 2005; Shoemaker et al., 2008). Aujourd'hui, cette molécule est en essai dans des études cliniques de phase I/II en monothérapie dans des cas de lymphomes et en combinaison avec des thérapies standards dans plusieurs cancers comme le cancer de la prostate, du côlon ou du poumon (Delbridge et al., 2016). Toutefois, l'action multi-cibles de cette molécule pourrait avoir des effets secondaires néfastes car il a été montré que les protéines de la famille BCL-2 sont essentielles à la formation des plaquettes et bien que la molécule soit bien tolérée elle induit une thrombopénie qui se maintient durant la totalité du traitement (Zhang et al., 2007). Il existe également des molécules BH3-mimétiques spécifiques d'une protéine de la famille BCL-2, comme le Venetoclax (ABT-199) qui est un inhibiteur

sélectif de BCL-2, qui ne vont pas provoquer de thrombopénie. Cette molécule a montré des résultats prometteurs, en monothérapie ou en combinaison avec des anticorps monoclonaux anti-CD20, dans des études cliniques de phase I et II chez des patients atteints de lymphomes et est désormais en études cliniques de phase III (Delbridge et al., 2016; Roberts et al., 2016).

Dorénavant, ce sont les stratégies thérapeutiques utilisant les BH3-mimétiques en combinaison avec des traitements ciblés, comme les anticorps monoclonaux ou les TKI, qui semblent privilégiées car elles semblent plus efficaces et moins toxiques que les traitements associant les BH3-mimétiques à la chimiothérapie (Cragg et al., 2009; Hikita et al., 2010).



D'autre part, comme les IAPs sont surexprimées dans de nombreux cancers et impliquées dans la survie cellulaire et la résistance aux traitements, plusieurs molécules inhibitrices ont été développées dont certaines sont actuellement utilisées dans des études cliniques (Ndubaku et al., 2009). Ces molécules sont appelées SMAC mimétiques car elles sont composées de la partie N-

terminale de la protéine SMAC. Par conséquent, elles vont se lier aux IAPs et bloquer leur interaction avec les caspases (Figure 21). Elles vont également stimuler l'auto-ubiquitylation et la dégradation des IAPs par le protéasome (Vince et al., 2007). En monothérapie, ces inhibiteurs ne sont efficaces pour induire la mort cellulaire que dans peu de cas (Fulda, 2015). Des études précliniques ont montré que les antagonistes des IAPs vont plutôt sensibiliser les cellules cancéreuses aux traitements anti-cancéreux, comme la chimiothérapie ou la thérapie ciblée avec les TKI (Fulda and Vucic, 2012). Ainsi, il semble que leur utilisation en combinaison soit nécessaire pour exploiter leurs capacités anti-tumorales en clinique. Des essais cliniques de type I, ont montré l'innocuité de l'administration (orale ou en intraveineuse) des SMAC mimétiques comme TL32711, LCL-161 et HGS1029 (Amaravadi et al., 2011; Infante et al., 2014; Sikic et al., 2011).

En conclusion, les résultats obtenus en clinique suite à l'utilisation des molécules BH3-mimétiques et plus particulièrement le Venetoclax sont très encourageants. D'ailleurs, ce dernier vient d'être approuvé par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*FDA, food and drug administration*) pour traiter certains cas de leucémie lymphoïde chronique (Roberts et al., 2016). Néanmoins, il reste de nombreux défis à relever afin de déterminer les conditions optimales d'efficacité des molécules ainsi que les combinaisons de traitements les plus efficaces.

L'émergence d'un cancer pourrait se définir par la rupture de l'équilibre entre survie et apoptose. L'objectif des traitements anti-cancéreux est de rééquilibrer la balance en inhibant les signaux de survie et/ou en favorisant les signaux de mort. Les récepteurs à dépendance ont la particularité de pouvoir jouer sur ces deux versants. Il est donc très intéressant de comprendre leur fonctionnement afin de trouver des molécules capables d'inhiber leur action pro-survie tout en maintenant leurs capacités à induire l'apoptose.

Objectifs de la thèse

Les RTKs représentent des cibles thérapeutiques majeures dans le traitement des cancers. Afin de les cibler le plus efficacement possible il convient (i) de bien comprendre leurs mécanismes d'action en condition physiologique mais également (ii) de caractériser les conséquences fonctionnelles de leurs altérations dans les cancers.

Le **premier objectif** de ma thèse a été de déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels le fragment p40MET induit la perméabilisation mitochondriale mais également d'évaluer l'implication des fonctions pro-apoptotiques de MET *in vivo*, en tirant parti de souris knock-in exprimant un mutant de MET non clivable par les caspases. Le but est d'élucider les mécanismes en faveur de l'apoptose et d'identifier de nouvelles cibles afin d'étendre, potentiellement, l'arsenal thérapeutique dans les cancers. Dans ce premier point, j'ai alors analysé les mécanismes utilisés par MET afin d'induire l'apoptose en l'absence de son ligand, une capacité que possèdent seulement quelques RTKs qui font partie de la famille des récepteurs à dépendance.

Dans un deuxième temps, j'ai souhaité élargir ma vision des RTKs en étudiant leur niveau d'activation dans les cancers. Les mutations somatiques de RTKs sont fréquemment retrouvées dans les cancers et sont le plus souvent directement liées à l'activation constitutive du domaine kinase. Ainsi, le **deuxième objectif** a été de rechercher des mutations de RTKs dans les cancers colorectaux à métastases hépatiques, pour lesquels peu de mutations ont été décrites, et d'analyser leurs conséquences sur l'activité kinase du récepteur. Ce travail a pour but d'interpréter la pertinence biologique et clinique des mutations identifiées par séquençage haut débit à partir d'échantillons de patients.

Résultats

I. La face cachée du récepteur MET : Impact sur la balance survie/apoptose *in vivo*

1. Contexte de l'étude

Afin de déterminer le devenir du récepteur MET en condition de stress, des cellules primaires hépatocytaires et neuronales ont été exposées à des traitements apoptotiques. C'est suite à ces expériences que mon laboratoire d'accueil a découvert, pour la première fois, l'existence d'un fragment de MET d'environ 40 kDa, le fragment pro-apoptotique p40MET (Tulasne et al., 2004). Ce fragment est produit à la suite du clivage de MET par les caspases. Toutefois, à ce moment-là, seul le site de clivage juxtamembranaire (ESVD1000), permettant la libération du fragment dans le cytosol, avait été identifié. C'est l'ajout d'un TAG-V5 en position C-terminale de MET qui a permis de révéler, 3 ans plus tard, la présence d'un second site de clivage en C-terminal de la protéine (DNID1374) qui est crucial à la fonction pro-apoptotique de MET. En effet, alors que la mutation de ce site n'altère pas la signalisation de MET, la capacité pro-apoptotique de MET est, elle, totalement perdue (Foveau et al., 2007). Des expériences de localisation subcellulaire par immunomarquage ont montré que p40MET n'était que partiellement localisé aux mitochondries par rapport au fragment pro-apoptotique d'un autre RTK, le fragment du récepteur TrkC qui lui est totalement localisé aux mitochondries (Ichim et al., 2013; Lefebvre et al., 2013). Cette localisation subcellulaire suggère que p40MET puisse se localiser sur des structures proches de la mitochondrie. D'autre part, l'équipe a déterminé que p40MET induisait la perméabilisation de la mitochondrie et la libération du Cytochrome C, responsables de l'amplification de l'apoptose (Lefebvre et al., 2013). Toutefois, les mécanismes permettant au fragment p40MET d'induire la perméabilisation mitochondriale étaient encore mal définis. De plus, nous ne connaissions pas l'implication du clivage de MET dans le processus d'apoptose *in vivo*.

2. Résumé de l'étude

Dans un premier temps, nous avons montré que le p40MET est en réalité localisé à l'interface entre le réticulum endoplasmique (RE) et les mitochondries. Ce sous-domaine appelé MAM est notamment impliqué dans les échanges calciques entre ces organelles. Ainsi localisé, le fragment p40MET est capable de favoriser une fuite massive de calcium du RE et sa recapture par les mitochondries. La surcharge calcique mitochondriale provoque finalement la perméabilisation des mitochondries et la libération de facteurs pro-apoptotiques. La régulation du flux calcique est essentielle à l'action pro-apoptotique du récepteur car l'inhibition des échanges calciques diminue l'activation de la caspase 3 et la perméabilisation de la membrane mitochondriale induite par p40MET. Ensuite, pour évaluer l'impact de ce clivage sur l'induction de l'apoptose *in vivo*, nous avons mis au point un modèle de souris transgéniques mutées sur le site de clivage C-terminal de MET. Ces souris

ont été développées à la clinique de la souris de Strasbourg avant mon arrivée en thèse. Tout d'abord, à partir de cellules primaires dérivées de ces souris MET knock-in (KI), nous avons mis en évidence que la mutation entraîne une diminution de leur sensibilité à des inducteurs d'apoptose. Nous avons observé la même tendance *in vivo* car nous avons démontré que les souris MET KI sont plus résistantes à l'apoptose après l'induction d'une hépatite fulminante. Ces résultats mettent en évidence l'importance de la production de p40MET dans l'amplification de l'apoptose *in vivo*. En conclusion, nos travaux démontrent pour la première fois que le récepteur MET agit comme un récepteur de dépendance *in vivo*, notamment dans le foie, et décrivent un mécanisme original de l'amplification de l'apoptose par p40MET impliquant la régulation du flux calcique.

Ce travail a permis l'écriture d'un papier original soumis pour publication au journal *Cell Death and Differentiation* et qui est actuellement en révision.

Publication n°2 : MET dependence receptor controls hepatocyte sensitivity to apoptosis through Ca²⁺ flux regulation

Leslie Duplaquet, Catherine Leroy, Audrey Vincent, Jonathan Lefebvre, Fabien Vanden Abeele, Steve Lancel, Florence Giffard, Gabriel Bidaux, Laurent Héliot, Laurent Poulain, Alessandro Furlan and David Tulasne

Révision CDD

MET dependence receptor controls hepatocyte sensitivity to apoptosis through Ca²⁺ flux regulation

Leslie DUPLAQUET¹, Catherine LEROY¹, Audrey VINCHENT¹, Jonathan LEFEBVRE¹, Fabien VANDEN ABEELE², Steve LANCEL³, Florence GIFFARD⁴, Gabriel BIDAUX⁵, Laurent HELIOT⁵, Laurent POULAIN⁴, Alessandro FURLAN^{1,5,*} and David TULASNE^{1,*}

¹ Univ. Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161 - M3T - Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, F-59000 Lille, France

² Univ. Lille, Inserm, U1003 - PHYCEL - Physiologie Cellulaire, F-59000 Lille, France

³ Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011 - EGID, F-59000, Lille, France.

⁴ Normandie Université, UNICAEN, INSERM U1199 (BioTICLA), Centre François Baclesse "Biology and Innovative Therapeutics for Locally Aggressive Cancers" (BioTICLA), Caen, France.

⁵ Univ. Lille, CNRS, UMR8523 - PhLAM - laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules, F-59000 Lille, France

* shared last authors

Correspondence to: alessandro.furlan@univ-lille.fr ; david.tulasne@ibl.cnrs.fr

Running Title: MET acts as a dependence receptor *in vivo*

Keywords: Receptor tyrosine kinase; Dependence receptor; Liver; Mitochondria; endoplasmic reticulum, caspases, calcium

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article

Financial Support

This work was supported by the CNRS, the Institut Pasteur de Lille, and INSERM, and by grants from the "Cancéropôle Nord-Ouest", the "Ligue Contre le Cancer, Comité Nord" the "SIRIC ONCOLille", the Région Hauts de France (CPER Photonics 4 Society and 1-PRIMER) and the "Institut National du Cancer".

Footnote**Contact information**

Corresponding authors Alessandro Furlan and David Tulasne

Alessandro Furlan

Univ. Lille, CNRS, UMR8523 - PhLAM - laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules, F-59000 Lille, France

alessandro.furlan@univ-lille.fr

David Tulasne

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

david.tulasne@ibl.cnrs.fr

Tel: 0033 3 20 87 12 57

Fax: 0033 3 20 87 11 11

Abstract (160 words)

The MET receptor was classified among the dependence receptors in light of its ability to induce either survival under ligand-stimulation or apoptosis upon its caspase cleavage. However, underlying molecular mechanisms and physiological relevance of MET pro-apoptotic function remained elusive. We evidence here that p40MET fragment generated by caspase cleavage localizes to the mitochondria-associated membrane (MAM) region. p40MET triggers a calcium transfer from the endoplasmic reticulum to the mitochondria, which is instrumental for the pro-apoptotic action of the receptor. In order to assess the impact of this cleavage *in vivo*, we engineered a transgenic knock-in mouse model bearing a mutation of MET caspase cleavage site. This transgenic model allowed us to highlight that p40MET production is important for Fas-driven hepatocyte apoptosis, and thus to demonstrate that MET acts as a dependence receptor *in vivo*. Our data shed light on new signaling mechanisms for dependence receptors' control of cell survival/death balance, which may offer new clues for the pathophysiology of epithelial structures.

Introduction

The Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor (HGF/SF) receptor MET was discovered three decades ago. Its importance was highlighted during embryogenesis and injury repair, and also in neurodegenerative diseases and cancers (1). MET activation triggers a wide variety of biological responses such as survival, proliferation, and migration. The HGF/SF-MET pair notably plays a crucial role in the liver, both during development (2) and, in adults, in tissue homeostasis and regeneration (3).

In addition to the survival role of ligand-activated MET, the receptor can also promote apoptosis. This has led to classifying it as a dependence receptor. MET cleavage by caspases leads to production of p40MET, an intracellular 40-kDa fragment that can amplify apoptosis, detected in apoptotic primary hepatocytes and mouse livers (4).

Caspase cleavage of MET occurs at the C-terminal DNID₁₃₇₄ and the juxtamembrane ESVD₁₀₀₀ sites (mouse sequence). The juxtamembrane site overlaps with the DY₁₀₀₁R site containing a phosphorylated tyrosine (ESVD₁₀₀₀p-Y₁₀₀₁R) responsible for the recruitment of CBL involved in the receptor degradation (5). Although C-terminal caspase cleavage of MET removes only five amino acids in mice, a p40MET fragment to which these C-terminal amino acids remain attached loses its apoptotic potential (6,7).

The p40MET fragment amplifies apoptosis through mitochondrial membrane permeabilization leading to the release of pro-apoptotic factors. Mitochondrial permeabilization is regulated by anti-apoptotic BCL2-family proteins and by pro-apoptotic BH3-only proteins such as BAX and BAK (8). While specific silencing of BAK significantly inhibits the apoptotic capacity of p40MET, no evidence of direct interaction between p40MET and a BH3-only protein has been reported to date nor the mechanism involved (4).

Besides their outer mitochondrial membrane (OMM) localization, the pro-apoptotic BH3-only proteins have also been described at the endoplasmic reticulum (ER) (9). In this organelle they can interact with calcium channels such as inositol triphosphate receptors (IP3R) and thereby cause deregulation of the calcium flux between the ER and the mitochondria (9–12). Several studies have shown calcium overload in the mitochondrial matrix to cause membrane permeabilization through mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) opening that can trigger mitochondrial swelling and OMM disruption (for review see (13)).

In the present study, we have evidenced p40MET in the Mitochondria-Associated endoplasmic reticulum Membrane (MAM) region and have characterized p40MET-triggered calcium transfer from the ER to the mitochondria, which is important for its proapoptotic activity. We have also engineered a knock-in mouse model expressing MET mutated at caspase site in order to assess its importance in physiological apoptosis *in vivo*.

Experimental procedures

Cytokines, drugs, and cell cultures. HGF/SF was purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA) Anisomycin from Calbiochem (San Diego, CA, USA) and staurosporine from Sigma (St Louis, MO, USA). Pan-caspase inhibitor zVAD-FMK was purchased from Calbiochem and Q-VD-OPH from Sigma. HEK293 cells and MCF10A human mammary epithelial cells were cultured as previously described (4). Bipotential mouse embryonic liver (BMEL) cells were harvested from E14 embryos as described (14).

Transfections and RNA interference. Transfections of HEK293 cells on 6-well plates and 60-mm Petri dishes were performed with FuGENE HD (Promega; 2 µg DNA, 8 µl FuGENE, 100 µl Opti-MEM in 1.5 ml complete medium) or in X-tremeGENE 9 DNA (Roche; 2 µg DNA, 3 µl X-tremeGENE 9, 100 µl medium without serum in 3 ml complete medium). For the immunofluorescence, MCF10A were plated on glass coverslips in 12-well plates (100,000 per well). The next day, they were transfected with FuGENE HD. For MCU silencing, MCF10A were first transfected with Lipofectamine 2000 (2.5 µl per ml final volume) with control Stealth siRNA or a combination of three MCU- siRNAs (HSS132001-3 Invitrogen) (150 nM final concentration). After that, transfection with the plasmid was carried out as described. For FRET, HEK293T cells were seeded on glass-bottom dishes (MatTek; coverslip #1.5) and transfected in FuGENE HD.

Plasmid engineering. p40MET-EGFP was obtained by insertion of the PCR-amplified cDNA with primers containing XhoI and BamHI restriction sites into pEGFPC3 (Clontech). BAK and BCL-XL fusions with mTurquoise 2 and SYFP2 were generated by PCR amplification on Flag-tagged BAK or BCL-XL (4) with EcoRI and XhoI restriction enzymes into mTurquoise2 and SYFP2 plasmids (Pr T.W. J. Gadella and Dr. J. Goedhart, Amsterdam). The IP3R1-EYFP plasmid was a kind gift from Dr. Geert Bultynck, Leuven, Belgium.

Antibodies. Fas antibody (Jo-2) was purchased from Becton Dickinson (New Jersey, USA). Antibody against the MET cytoplasmic domain was purchased from Life Technology (3D4/37-0100). Antibody against the C-terminal domain of human MET (L41G3), the MET phosphorylated tyrosine (Y1234/1235)(#3126), the p44 MAP kinase (#9106), AKT Ser-473 (#9271), MCU, and cleaved Casp3 (asp175, #9661) were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Antibody against cytochrome c (20E8) was purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). Antibody against calnexin (ab75801) was purchased from Abcam (Cambridge, MA), antibody against FACI4/ACSL4 (NBP2-16401) from Novus Biologicals (Oakville, ON, Canada), antibody against GFP from Sigma (Saint Louis, MO).

Green-fluorescent Alexa fluor 488 conjugated anti-mouse IgG and red-fluorescent Alexa fluor 594 conjugated anti-rabbit IgG were purchased from Invitrogen. Antibodies against PARP-1 (sc-32233), GAPDH, ERK2 (SC-154) and AKT (SC-8312) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Peroxidase-coupled secondary antibodies were from Jackson Immunoresearch Laboratories (West-Grove, PA).

Immunofluorescence staining. MCF-10A were plated on glass coverslips in 12-well plates (100,000 per well) and transiently transfected the next day as described. BMEL cells were plated on μ -slide 8-well poly-L-lysine (Ibidi, 20,000 per well) and treated for 4 h with staurosporine (1 μ M). After transfection or treatment, the cells were washed and fixed in 4% PFA. They were permeabilized with PBS containing 0.5% Triton X-100 and blocked 30 min in 0.2% casein. Incubation with primary antibodies was carried out for 1 h. The cells were washed with PBS and incubated for 1 h with a combination of Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG and Alexa Fluor 594 anti-rabbit IgG; 2 μ g/ml). The nuclei were counterstained with Hoechst 33258. For fluorescence microscopy, slides were observed in an Axion Imager Z1 (Carl Zeiss), numerical aperture PC-Plan NEOFLUAR 40x/1.3 oil and the ZEN acquisition software. Ibidi chambered coverslips were observed in an inverted-lens microscope (AxioObserver Z1 Video-DG4 numerical aperture; Plan APOCHROMAT 40x/1.3 oil). Mitochondria were stained with 100 nM MitoTracker (Invitrogen). Cells were washed and fixed in methanol:acetone (1:1 v/v). MAM and ER staining was performed as described. Slides were observed in an LSM 880 Laser Scanning Confocal Microscope (Carl Zeiss), numerical aperture PLAN-APOCHROMAT 63x NA 1.4. Weighted colocalization coefficients were measured with the JACoP plugin of ImageJ software using Manders Coefficients.

Immunohistochemistry staining. Livers were fixed in 4% PFA, dehydrated in successive baths (30%, 70%, 95%, and 100% ethanol and toluene), and paraffin-embedded. Immunohistochemistry was performed to detect cleaved caspase 3 using a Ventana Discovery XT autostainer on 4 μ m-thick sections. Slides were deparaffinized with EZPrep buffer and epitopes unmasked in CC1 EDTA buffer. Sections were incubated 40 minutes with anti-cleaved caspase 3 antibody (1/1000). Secondary antibody (Omnimap Rabbit Ventana) was incubated 16 minutes. After washes, staining was performed with DAB and sections were counterstained with Hematoxylin. Whole slide images were digitized at 20 \times using the ScanScope CS scanner (Leica Biosystems, Nussloch, Germany).

Subcellular fractionation. MCF10A were treated for 4 h with staurosporine (1 μ M) and the MAM, ER, and mitochondrial fractions were isolated as previously described. (15).

FLIM-FRET. HEK293T cells were seeded into 35-mm glass-bottom dishes (MatTek, Ashland, MA) and transfected as described. Imaging was performed at 37°C in a thermostatic chamber in L-15 medium. FLIM was carried out with a Nikon A1 inverted confocal coordinated with a 440 nm pulsed laser (PicoQuant, Berlin, Germany) set at 40 MHz. FRET experiment were performed by Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) methods by using hybrid detector (Picoquant) and a TCSPC counting card for photon counting (HydraHarp400; PicoQuant). NIS (Nikon) and SymPhoTime64 (PicoQuant) softwares were used to handle acquisition. Fluorescence lifetime determinations were performed as described (16). FRET efficiency was calculated as follows: $EFRET=1-T_{DA}/T_D$, from measurement of the donor lifetime in presence of the acceptor (T_{DA}) and the donor alone lifetime (T_D) in reference.

Calcium measurements. HEK293 cells were grown on a glass bottom dish and transfected as described. 24 h later, cells were loaded for 30 min at 37°C with 5 μ M Fura-2 AM immediately prior to acquisition and rinsed in HBSS medium with 0.04 g EGTA pH>7. The emitted fluorescence of Fura-2 was captured at 510 nm with a photomultiplier-based system (Photon Technologies International Ltd, Princeton, NJ) after cell excitation at alternately 340 and 380 nm. Thapsigargin (1 μ M) was added 5 min after the start of acquisition. $[Ca^{2+}]$ was calculated from the ratio of the emitted fluorescence excited by 340 light to that excited by 380 nm light (17). The 4mtD3cpv biosensor was a generous gift from Roger Tsien (University of California, San Diego). FRET transfer was measured by lifetime analysis, as described. To measure mitochondrial calcium in BMEL, the cells were resuspended in calcium buffer (150 mM KCl, 5 mM KH_2PO_4 , 1 mM $MgCl_2$, 5 mM Tris pH 7.4) containing 0.5 μ M rotenone, 10 mM succinate, and 2.5 mM ADP. They were then permeabilized with 2.5 μ g/millions-of-cell digitonin. Cells were placed in an Oroboros chamber (Oroboros Oxygraph-2k Instruments) and calcium green probe (Life Technologies) was added at 0.2 μ M and the fluorescence intensity was measured with an O2K-Fluo Led2-module. A pulse of calcium was delivered every 2 min (10 μ M final concentration) until the mitochondria became overloaded.

Real-time RT-PCR. Total RNA was extracted with the Nucleospin RNA/Protein Kit (Macherey-Nagel). cDNA was reverse-transcribed with random hexamers (Applied Biosystems, Green Island, NY, USA). Levels of CK19, HNF4a, aldolase b, and albumin mRNAs were evaluated by real-time RT-PCR with Fast SYBR Green mix (Applied Biosystems). Relative gene expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The level of each transcript was normalized to the peptidylprolyl isomerase A (PPIA). The primer were: CK19 (, 5'-CCTGGAGATGCAGATTGAGAG-3'; 5'-AGGATCTTGGCTAGGTCGACA-3'); HNF4a (5'-CCTCTTCTTCTTCTGGTGC-3'; 5'-GCCTCCAGAGAGATGGCTTTA-3'), Aldolase b (5'-

AGCGGGCTATGGCTAAC-3'; 5'-GAGGCTGTGAAGAGCGAC-3'); and Albumin (5'-AAGGCTGCTGACAAGGAC-3'; 5'-GGTTGTGGTTGTGATGTG-3').

Mouse model strategy. Transgenic MET D1374N mice were obtained at the Mouse Clinical Institute in Strasbourg, France by homologous recombination in C57/bl6 embryonic stem cells with a plasmid bearing exons 21, 22 *met* gene with the GAT codon coding residue Asp1374 mutated to AAT coding for an Asn. A floxed neo cassette was inserted downstream of the *met* sequence. After Cre recombinase action, a unique loxP site remained. Chimeric mice were obtained after injection of mutated ES cells and crossed with C57/bl6 mice. The mice were cared in accordance with FELASA recommendations with protocols approved by the CEEA75 Ethics Committee (agreement B59-350009). Mice were genotyped by PCR: 5'-AAATCGGTAGCTCTCCGTAATTCATCC-3' and 5'-CCTGAATCAGGCATCTCACAATGATCT-3'.

Fas-injection-induced apoptosis in mice. For the *in vivo* apoptotic studies, male C57BL/6 mice weighing 20-30 g, were force-fed with 200 µl of 5 mg/ml Crizotinib (Sigma) 5 days, 2 days, and 1 day before the experiment. After fasting overnight, the mice were injected intraperitoneally with 4 µg anti-Fas antibody (Jo2, 4 µg/20 g). Four hours later, the mice were sacrificed by cerebral dislocation. Their livers were perfused with PBS, quickly removed, and placed in 4% PFA.

Western blotting. Western blotting was performed as previously described (18).

Results

p40MET localizes to the interface between the ER and the mitochondria

To gain insights into the pro-apoptotic p40MET signaling, we investigated the subcellular localization of the fragment by generating chimeric constructs with Green Fluorescent Protein (GFP) fused either to pro-apoptotic p40MET or to its non-apoptotic variant p40MET D1374N, mutated at the C-terminal caspase site (Figures 1a, S1a). In MCF10A epithelial cells, GFP-p40MET induced cytochrome C release and caspase 3 cleavage as efficiently as flag-p40MET, in contrast to GFP-p40MET D1374N or GFP alone (Figure 1b-c and representative pictures in Figure S1b-c). Because of a partial overlap between p40MET and mitochondrial signals acquired by immunofluorescence (4)(Figure S1d), we wondered whether p40MET might localize to a peculiar zone very close to mitochondria, namely the MAM region. MAMs constitute a subdomain with direct interactions between the ER and mitochondria. They notably play a crucial role in amplifying cell death (19). We thus examined whether p40MET might co-localize with Fatty Acid CoA Ligase 4 (FACL4), a protein residing mostly in MAMs, and this proved to be the case (Figure 1d). FACL4 was also found to colocalize with the p40MET D1374N fragment, but not with GFP. To confirm this localization, endogenous p40MET was generated by an apoptotic stress and subcellular fractionation was performed. Mitochondrial fraction was enriched in the mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU) and an ER fraction in the ER chaperon protein calnexin. The MAM fraction displayed both MCU and calnexin, as expected, and was enriched in FACL4 (Figure 1e). p40MET was found exclusively in the MAM fraction, in agreement with the immunofluorescence.

The p40MET fragment partners with the BH3-only protein BAK

The subcellular localization of the proapoptotic p40MET fragment prompted us to further investigate functional relationship between p40MET and BCL2 family proteins. Indeed, beside their localization at the outer membrane of mitochondria, BCL2 proteins were found localized at the ER both localization being involved in apoptosis regulation. We have previously demonstrated that BAK silencing or BCL-XL overexpression inhibits p40MET-induced mitochondrial permeabilization (4). However, the mechanisms involved were totally unknown. To elucidate whether p40MET, BAK and BCL-XL interact with each other, FRET (Förster Resonance Energy Transfer) experiments were conducted with plasmids encoding mTurquoise2 (mT2) or Super Yellow Fluorescent Protein 2 (SYFP2) fused to p40MET, BAK, or BCL-XL (Figure 2a, S2a-b). As positive control, BAK-mT2 and BCL-XL-SYFP2 co-transfection led to a mean FRET efficiency of 8%, while it was negligible (<0.1%) with vector encoding freely diffusing SYFP2 (Figure 2b). Co-transfection with the vectors encoding p40MET-SYFP2 and BAK-mT2 also gave rise to FRET about 2.5% efficiency (Figure 2b). In the reverse donor-acceptor configuration, we found a mean FRET efficiency of 4% confirming the interaction (Figure 2c). In contrast, p40MET-mT2 hardly

interacted with BCL-XL (1.5% mean FRET efficiency). These results are to be compared with the 1% FRET efficiency recorded for negative control cells co-transfected with freely diffusing SYFP2 (Figure 2c). Since BAK can control apoptosis via the modulation of ER Ca^{2+} release (12), we wondered whether we might detect interactions between BAK or p40MET and IP3Rs. No FRET was detected between BAK-mT2 or p40MET-mT2 and IP3R1-EYFP (Figures 2b-c). Hence, this last part of experiment does not allow us to conclude on the putative involvement of IP3R in p40MET-triggered apoptosis. Taken together, these results suggest that p40MET interacts directly with BAK and that this partner might participate in the pro-apoptotic action of p40MET.

Apoptosis amplification by p40MET involves calcium flux deregulation

Under stress conditions, the ER can release Ca^{2+} via functional units present mostly in MAMs. Within MAMs IP3R channels are very close to the MCU channels of the mitochondria, and this allows Ca^{2+} uptake by the mitochondria. Ca^{2+} overload in the mitochondria leads to their permeabilization and ultimately to apoptosis (19). Because, BAK has been described to play role in this process by promoting Ca^{2+} release from the ER (12), we checked for a possible involvement of Ca^{2+} in p40MET-induced apoptosis. We found p40MET-induced cytochrome C release to be inhibited in cells cultured in Ca^{2+} -free medium or in presence of the Ca^{2+} chelator (Figure 3a-b). Similar inhibitions were observed upon treatment with xestospongine B, a potent IP3R inhibitor, or with an siRNA against MCU (Figure 3c-e). Apoptosis induced by staurosporine was unaffected by such treatments (Figure S3a-c). Taken together, our data demonstrate that a Ca^{2+} flux between the ER and mitochondria is required for p40MET-induced cytochrome C release from the mitochondria.

To further evaluate the impact of p40MET on Ca^{2+} exchange, we used thapsigargin, a sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) inhibitor, causing depletion of the ER Ca^{2+} and allowing indirect measurement of the ER Ca^{2+} concentration with a cytosolic calcium probe. After thapsigargin addition, GFP-p40MET-expressing cells showed a significantly lower fluorescence peak than cells expressing GFP-p40MET D1374N or GFP. This suggests that the ER Ca^{2+} pool was depleted after p40MET transfection (Figure 3f). To see if this depletion was accompanied by Ca^{2+} accumulation in the mitochondria, we used a mitochondrion-specific biosensor, 4mtD3cpv, consisting of fluorescent probes linked by a calmodulin binding site and allowing Ca^{2+} -dependent modulation of FRET. We found p40MET transfection to increase the FRET efficiency by 26% ($p=0.0013$) as compared to transfection with a control plasmid, suggesting a substantial increase of the calcium concentration in mitochondria (Figure 3g). Lastly, we examined whether mPTP pore opening might participate in p40MET-induced apoptosis. As suspected, mPTP inhibition by cyclosporin A was found to reduce the p40MET-induced

apoptosis (Figure 3h). Altogether, these data show that p40MET impairs the ER-to-mitochondria calcium homeostasis, eventually causing a mitochondrial calcium overload and permeabilization.

Generation of a new MET knock-in mouse model and derived primary cell lines to study MET pro-apoptotic activity

To investigate the *in vivo* involvement of MET cleavage in apoptosis, we used Cre-Lox recombination to develop a knock-in mouse model where the MET gene locus is modified in the C-terminal caspase site (Figures 4a-b). The mutation introduced is D1374N, as in the above-described *in vitro* experiments where it was used to prevent C-terminal cleavage. We chose to mutate residue D1374 rather than the juxtamembrane residue D1000 because the latter also belongs to the DYR sequence driving Cbl recruitment, mutating it would probably alter both mechanisms.

As *in vivo* studies on apoptosis classically induce the animal's death and in order to comply with animal model ethics recommendations, we chose first to derive primary cell models to validate the relevance of MET cleavage by caspases *ex vivo* and to evaluate the response to several apoptotic conditions. We focused on primary cells that are long-lived and do not require animal dissection for each experiment. First results showing D1374N Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) to be more resistant than wild-type to anisomycin treatment evidenced the importance of the caspase cleavage site for optimal apoptosis (Figure S4a-b). MEFs, however, produce relatively low levels of MET receptor (6), so we chose to derive more relevant long-lived cells, namely Bipotential Mouse Embryonic Liver (BMEL) cells to analyze MET involvement in the liver survival-apoptosis balance. Several WT and MET D1374N BMEL clones were derived from embryonic livers. We selected two WT clones (A and B) and two D1374N clones (A and B) displaying comparable BMEL marker expression quantified by RT-Q-PCR (*KRT19*, *HFN4a* as BMEL markers; *ALDOB*, *ALB*, as markers of differentiated hepatocytes) (Figures 4c, S4c). We first found WT and D1374N BMEL clones to show comparable doubling times (Figure 4d). In addition, HGF/SF stimulation induced islet scattering with equal efficiency in the WT and D1374N clones (Figure 4e). The D1374N MET mutation likewise did not alter either HGF-induced MET phosphorylation or AKT and ERK phosphorylation (Figure 4f). Similar results were obtained with the other pair of WT and D1374N BMEL clones (Figure S4d-e). Lastly, massive apoptosis induced by a 7h staurosporine treatment led to generation of the p40MET fragment in the WT cells and of a slightly longer p40MET D1374N fragment in the D1374N cells, in agreement with the presence of the C-terminal tail, which was prevented by pan-caspase inhibitors (Figure 4g). In conclusion, hepatic progenitors from WT and D1374N mice responded similarly to HGF/SF but produced, under apoptotic conditions, either p40MET or the longer p40MET D1374N fragment.

Hepatic progenitors depend on p40MET to complete the apoptosis process

A first hint regarding the relative sensitivities of WT and MET D1374N cells to apoptosis was obtained by removing the collagen coating and comparing the abilities of these cells to adapt to this stress. Whereas the WT cells failed to grow under these conditions, MET D1374N BMEL cells formed small clusters from day 2, showing a better capacity to cope with the loss of matrix-driven signals (Figures 5a, S4f). Next, a 4h treatment with staurosporine, used to induce partial apoptosis, proved suitable for comparing cell death in the two cell lines. While staurosporine treatment induced caspase 3 and PARP cleavages in the WT cells, these cleavages were undetected in the MET D1374N cells (Figure 5b). Immunostaining for cleaved caspase 3 further showed the MET D1374N cells to be more resistant than the WT cells to staurosporine-induced apoptosis (Figure 5c). These results demonstrate the importance of MET cleavage for apoptosis amplification in hepatic progenitors.

To assess how calcium flux affects apoptosis in this cell model, we evaluated caspase 3 activation after Ca^{2+} flux inhibition. First, a lower percentage of MET D1374N BMEL cells than WT cells displayed staurosporine-induced caspase activation as shown above (Figure 5d). Second, only the WT population responded to the additional presence of the IP3R inhibitor xestospongine, confirming involvement of Ca^{2+} flux for p40MET induced cell death. Next, to evaluate mitochondrial Ca^{2+} uptake by WT and MET D1374N BMEL cells, we assessed the capacity of BMEL-cell mitochondria to buffer cytoplasmic Ca^{2+} increases upon addition of exogenous Ca^{2+} . We treated WT and MET D1374N BMEL cells with staurosporine, permeabilized and incubated them with a calcium-green fluorescent probe, and injected exogenous Ca^{2+} . A rapid and transient increase in cytosolic Ca^{2+} was followed by a decrease due to uptake of the Ca^{2+} excess by the mitochondria (Figure 5e). This process was repeated until mitochondrial uptake was no longer possible, as attested by a fluorescence plateau. After the first injections, MET D1374N cells took up Ca^{2+} more efficiently than WT cells. Furthermore, on average, mitochondrial uptake stopped in the WT cells at a total concentration of 100 μM , versus 140 μM for the MET D1374N cells (Figure 5e-f). This lower Ca^{2+} uptake capacity of staurosporine-treated WT BMEL cells as compared to MET D1374N BMEL cells suggests that the former are already overloaded with Ca^{2+} , possibly because of p40MET generation.

C-terminal caspase cleavage of MET is required *in vivo* for optimal apoptosis in the mouse liver

WT and MET D1374N mice displayed no obvious phenotypic differences and interbreeding between WT, D1374N, and heterozygous mice gave the expected Mendelian distributions (Figure 6a-b). D1374N mice did not display any notable developmental anomalies. We looked most carefully at the organization of the liver and mammary glands, organs known to require MET activity for their proper morphogenesis, which displayed normal organization (Figure 6c, S5).

To investigate the sensitivity of WT and MET D3174N mouse liver tissues to apoptosis, we focused on FAS-induced fulminant hepatitis, a condition in which HGF/SF production is reported to promote hepatocyte survival (20). To prevent any survival response induced by ligand-activated MET, mice were treated beforehand with crizotinib, a potent clinically used MET inhibitor (21). HGF/SF was indeed able to induce a survival response in primary hepatic progenitors and this response was reduced by crizotinib (Figure S6a-b). Therefore, mice received crizotinib orally before administration of Fas agonistic antibody by intraperitoneal injection. Caspase 3 activation was scored on liver slices according to the proportion of positive cells (from negative - to highly positive +++). As expected, the livers of animals not having received a Fas injection were negative for cleaved caspase 3 staining (Figure S7a). Four hours after FAS injection, the WT mice displayed more caspase 3 activation than D1374N mice, with respectively 50% (7/13) and 14.3% (2/15) highly positive livers. Conversely, one WT liver out of 13 (8.3%) was found negative for caspase 3 activation, as opposed to 50% (7/15) of the D1374N livers (Figure 7b and also Figure S7b for a complete-panel illustration). Overall, 91.7% (12/13) of the WT mice were positive for cleaved caspase 3 staining, as compared to 50% (8/15) of the MET D1374N mice. The MET D1374N mice thus displayed resistance to FAS-induced caspase 3 activation in the liver, which demonstrates the importance of MET C-terminal caspase cleavage for optimal apoptosis *in vivo*.

Discussion

The function of a protein is largely determined by its location and by its molecular partners. This is well illustrated by the MET dependence receptor. Whereas full-length MET is located at the plasma membrane and allows response to its ligand, MET cleavage by caspases in the absence of its ligand unleashes an intracellular fragment that can amplify apoptosis. The p40MET fragment thus affects the activity of the mitochondria, a central hub in determining the cell life/death balance.

In this study we demonstrate that p40MET localizes to MAMs, a microdomain where the ER is closely apposed with mitochondria. A growing body of evidence demonstrates that this microdomain is involved in various cellular processes, including intra-organelle Ca^{2+} exchange. The juxtaposed membranes promote ER-mitochondrion Ca^{2+} transfer through the IP3R channel at the ER membrane and through the VDAC and MCU channels at the outer and inner mitochondrial membranes. Massive calcium entry into the mitochondria leads to mPTP opening, enabling the release of mitochondrial components. Interestingly, BCL-2 family proteins are shown to localize to both the ER and the mitochondria and to control calcium homeostasis (11,12). The anti-apoptotic members Bcl-2 and Bcl-XL can interact with IP3R channels and modulate ER Ca^{2+} homeostasis, thus promoting apoptosis resistance (22). Conversely, the pro-apoptotic proteins BAX and BAK can induce massive calcium leakage from the ER, followed by mitochondrial Ca^{2+} accumulation and apoptosis (10). Recent findings demonstrate that BAK facilitates calcium transfer by promoting contacts between mitochondria and the ER (23). We have previously reported BAK silencing or Bcl-XL overexpression to reduce p40MET-induced apoptosis (4). Interestingly, the results of our FRET experiments show that p40MET interacts with BAK but not Bcl-XL.

Given the observed localization and BAK being a partner of p40MET, we investigated p40MET possible involvement on calcium flux regulation. We show here that inhibiting calcium exchanges prevents p40MET-induced apoptosis, since culturing cells in Ca^{2+} depleted medium impairs the pro-apoptotic action of p40MET, as does treatment with an inhibitor of ER (IP3R) or mitochondrial (MCU) calcium channels. Furthermore, using Ca^{2+} probes with different specificities, we have shown that in the presence of p40MET, the ER is depleted of Ca^{2+} while the mitochondria are overloaded. The MAM location of p40MET is thus in agreement with its action on the intrinsic apoptotic pathway. In the light of our various findings, we propose that upon MET cleavage by caspases, p40MET is released into the cytoplasm where it interacts with BAK at MAMs and promotes a Ca^{2+} flux from the ER to the mitochondria, causing mitochondrial permeabilization and apoptosis amplification (Figure 7).

The MET receptor's ability to induce both survival in the presence of ligand and apoptosis in the absence of ligand enables us to classify it as a dependence receptor. Dependence receptors displayed

a great variety of mechanisms to promote apoptosis (24). For example, both DCC and UNC5H receptors undergo caspase cleavage and act as caspase activators though death-domain unmasked by the cleavage and carried by the part that remains membrane-anchored (25,26). The TrkC receptor, on the other hand, releases upon caspase cleavage a pro-apoptotic fragment which shuttles to the mitochondria and promotes BAX activation (27). We highlight here another original mechanism. To the best of our knowledge, this is the first time a dependence receptor has been shown to act via regulation of the Ca²⁺ flux.

Knock-out of the *Met* or *Hgf/sf* gene is lethal *in utero* and leads to a reduced liver size associated with decreased hepatocyte proliferation (28,29). Furthermore, altered liver regeneration has been found in MET-deficient mice (30). Here we have engineered a novel knock-in model to investigate the physiological impact of the pro-apoptotic p40MET fragment. We have found that liver and mammary gland organogenesis, both of which depend on MET pro-survival signaling, are not affected by the MET D1374N mutation. These data validate the specificity of our model for studying MET pro-apoptotic activity. Following apoptosis induction with a FAS agonist and pretreatment with MET inhibitor to prevent ligand-dependent survival, we observed more apoptosis in WT than in MET D1374N mouse livers, thus evidencing for the first time that MET acts as a dependence receptor *in vivo*. It would be interesting now to assess the importance of p40MET pro-apoptotic activity in pathological situations such as hepatic steatosis, in which cells expressing the MET receptor face and try to adapt to stresses.

Dependence receptors have placed the role of apoptosis in tumorigenesis in an unexpected perspective. Overexpression of the ligand of the Deleted in Colorectal Cancer (DCC) dependence receptor inhibits its pro-apoptotic activity and can promote spontaneous adenoma formation (31). Although DCC-deficient mice (like MET D1374N mice, data not shown) do not develop spontaneous tumors, experiments in which they were crossed with mice bearing a cancer-predisposing APC mutation suggest that DCC acts as a conditional tumor suppressor gene (32). In agreement with this concept, the COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database lists six MET mutations affecting the MET caspase sites in various cancers. Also described are exon 14 splice-site mutations found in 3% of pulmonary tumors leading to loss of the MET juxtamembrane domain, that contain the caspase site leading to p40MET release (33). Altogether, the presence of these multiple MET-caspase-cleavage-abolishing mutations supports the notion that the MET pro-apoptotic function might put a brake on tumorigenesis.

This study highlights MET as a key regulator of the cell survival-apoptosis balance. In addition to shedding light on pathophysiological mechanisms, this feature of MET may be relevant to their therapeutic targeting. In diseases with exacerbated cell death, such as hepatic steatosis, one might

restore the balance by favoring MET pro-survival signaling with ectopic HGF/SF treatment. To favor cancer cell death on the other hand, one might combine MET kinase activity inhibition with agents promoting its pro-apoptotic action. Elucidating the mechanisms of MET pro-survival and pro-death signaling is instrumental to identifying new possible targets and to expanding, potentially, the therapeutic arsenal.

References

1. Furlan A, Kherrouche Z, Montagne R, Copin M-C, Tulasne D. Thirty years of research on met receptor to move a biomarker from bench to bedside. *Cancer Res.* 1 déc 2014;74(23):6737-44.
2. Maina F, Panté G, Helmbacher F, Andres R, Porthin A, Davies AM, et al. Coupling Met to specific pathways results in distinct developmental outcomes. *Mol Cell.* juin 2001;7(6):1293-306.
3. Borowiak M, Garratt AN, Wüstefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 20 juill 2004;101(29):10608-13.
4. Lefebvre J, Muharram G, Leroy C, Kherrouche Z, Montagne R, Ichim G, et al. Caspase-generated fragment of the Met receptor favors apoptosis via the intrinsic pathway independently of its tyrosine kinase activity. *Cell Death Dis.* 2013;4:e871.
5. Peschard P, Ishiyama N, Lin T, Lipkowitz S, Park M. 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.* 9 juill 2004;279(28):29565-71.
6. Foveau B, Leroy C, Ancot F, Deheuninck J, Ji Z, Fafeur V, et al. Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ.* avr 2007;14(4):752-64.
7. Ma J, Zou C, Guo L, Seneviratne DS, Tan X, Kwon Y-K, et al. A novel Death Defying Domain in Met entraps the active site of Caspase-3 and blocks apoptosis in hepatocytes. *Hepatology.* mai 2014;59(5):2010-21.
8. Wei MC, Zong W-X, Cheng EH-Y, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science.* 27 avr 2001;292(5517):727-30.
9. Zong W-X, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu Q-C, Yuan J, et al. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol.* 7 juill 2003;162(1):59-69.
10. Nutt LK, Pataer A, Pahler J, Fang B, Roth J, McConkey DJ, et al. Bax and Bak Promote Apoptosis by Modulating Endoplasmic Reticular and Mitochondrial Ca²⁺ Stores. *Journal of Biological Chemistry.* 15 mars 2002;277(11):9219-25.
11. Oakes SA, Scorrano L, Opferman JT, Bassik MC, Nishino M, Pozzan T, et al. Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 4 janv 2005;102(1):105-10.
12. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, et al. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science.* 4 avr 2003;300(5616):135-9.
13. Brenner C, Grimm S. The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene.* 7 août 2006;25(34):4744-56.
14. Strick-Marchand H, Weiss MC. Inducible differentiation and morphogenesis of bipotential liver cell lines from wild-type mouse embryos. *Hepatology.* oct 2002;36(4 Pt 1):794-804.

15. Wieckowski MR, Giorgi C, Lebedzinska M, Duszynski J, Pinton P. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc.* 2009;4(11):1582-90.
16. Leray A, Padilla-Parra S, Roul J, Héliot L, Tramier M. Spatio-Temporal Quantification of FRET in living cells by fast time-domain FLIM: a comparative study of non-fitting methods [corrected]. *PLoS ONE.* 2013;8(7):e69335.
17. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 25 mars 1985;260(6):3440-50.
18. Paumelle R, Tulasne D, Kherrouche Z, Plaza S, Leroy C, Reveneau S, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene.* 4 avr 2002;21(15):2309-19.
19. Naon D, Scorrano L. At the right distance: ER-mitochondria juxtaposition in cell life and death. *Biochim Biophys Acta.* oct 2014;1843(10):2184-94.
20. Kosai K, Matsumoto K, Nagata S, Tsujimoto Y, Nakamura T. Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 27 mars 1998;244(3):683-90.
21. Zhang Y, Wang W, Wang Y, Xu Y, Tian Y, Huang M, et al. Response to Crizotinib Observed in Lung Adenocarcinoma with MET Copy Number Gain but without a High-Level MET/CEP7 Ratio, MET Overexpression, or Exon 14 Splicing Mutations. *Journal of Thoracic Oncology.* mai 2016;11(5):e59-62.
22. Li C, Wang X, Vais H, Thompson CB, Foscett JK, White C. Apoptosis regulation by Bcl-x(L) modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel isoform gating. *Proc Natl Acad Sci USA.* 24 juill 2007;104(30):12565-70.
23. Mebratu YA, Leyva-Baca I, Wathelet MG, Lacey N, Chand HS, Choi AMK, et al. Bik reduces hyperplastic cells by increasing Bak and activating DAPk1 to juxtapose ER and mitochondria. *Nat Commun.* 06 2017;8(1):803.
24. Negulescu A-M, Mehlen P. Dependence receptors - the dark side awakens. *FEBS J.* 18 mai 2018;
25. Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J.* 1 juin 2001;20(11):2715-22.
26. Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature.* 22 oct 1998;395(6704):801-4.
27. Ichim G, Genevois A-L, Ménard M, Yu L-Y, Coelho-Aguiar JM, Llambi F, et al. The dependence receptor TrkC triggers mitochondria-dependent apoptosis upon Cobra-1 recruitment. *Mol Cell.* 12 sept 2013;51(5):632-46.
28. Schmidt C, Blatt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature.* 23 févr 1995;373(6516):699-702.

29. Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, et al. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature*. 23 févr 1995;373(6516):702-5.
30. Huh C-G, Factor VM, Sánchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci USA*. 30 mars 2004;101(13):4477-82.
31. Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, Pays L, Arnaud S, Gespach C, et al. Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature*. 2 sept 2004;431(7004):80-4.
32. Castets M, Broutier L, Molin Y, Brevet M, Chazot G, Gadot N, et al. DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature*. 23 févr 2012;482(7386):534-7.
33. Duplaquet L, Kherrouche Z, Baldacci S, Jamme P, Cortot AB, Copin M-C, et al. The multiple paths towards MET receptor addiction in cancer. *Oncogene*. 19 mars 2018;

Acknowledgments

We thank Dr Jérôme Kluza, Pr Tony Lefebvre, and all members of our team for help and discussions. We are most grateful to Dr Damien Grégoire and Dr Urszula Hibner for their help in establishing and characterizing BMEL cells. We thank Flavio Maina's team for kindly providing us with murine hepatocyte RNAs. We thank the BioImaging Center Lille (BICeL) and EquipEX ImaginEx BioMed for microscopy supplies and advice. We thank A. Leray for the MAPI software. We also thank Ludovic Mercier and David Hannebique for their assistance in maintaining mouse strains.

Figure Legends

Figure 1. Locating the p40MET fragment by immunofluorescence and subcellular fractionation

(a) Schematic representation of MET receptor cleavage by caspase during apoptosis, with besides representation of the GFP-p40MET fragment and the GFP-p40MET D1374N fragment which still possesses the C-terminal tail. (b, c) MCF10A epithelial cells were transiently transfected with a vector expressing GFP, GFP-p40MET, GFP-p40MET D1374N, or flag-p40MET. Twenty-four hours after transfection, the cells were fixed and labeled with an appropriate antibody: anti-flag when transfected with the vector expressing flag-p40MET, anti-cytochrome C or anti-cleaved caspase 3 antibody to evaluate apoptosis. The percentage of cytochrome C release or of caspase-3-positive cells was determined with respect to the number of GFP- or flag-positive cells. At least 150 (b) or 200 (c) cells were counted per well ($n=6$; \pm S.D.). (d) MCF10A epithelial cells were transfected with a vector expressing GFP, GFP-p40MET, or GFP-p40MET D1374N. Twenty-four hours after transfection, the nuclei were stained with Hoechst (blue staining) and immunofluorescence staining was performed with anti-FACI4 to label the MAMs (red staining). Cells were observed by fluorescence confocal microscopy. Weighted colocalization coefficients were determined by means of Manders coefficients for green staining (of GFP, GFP-p40MET, or GFP-p40MET D1374N) and FACI4 staining (red) on the basis of the fluorescence confocal microscopy images ($n=30$; \pm S.D.). (e) MCF10A cells were starved overnight and treated for 4h with 1 μ M staurosporine (STS). After treatment, the cells were fractionated into ER, MAM and mitochondrial fractions. Proteins from whole-cell lysates and from the different fractions, were loaded in equal amount, and analyzed by western blotting with antibodies against the MET kinase domain, the reticular protein calnexin, the MAM protein FACI4, and the inner mitochondrial membrane protein MCU. The positions of prestained molecular weight markers are indicated. Arrows indicate the positions of p40MET, calnexin, FACI4 and MCU; scale bar=10 μ m, ns, nonsignificant; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$ as determined by Student's *t* test.

Figure 2. FRET measurement to analyze p40MET and BAK interaction

(a) Schematic representation of the mTurquoise2- or SYFP2-tagged proteins used for FRET analysis. (b) Cells were co-transfected with a vector expressing BAK-mT2 as FRET donor and with a vector expressing free SYFP2, BCL-XL-SYFP2, or p40MET-SYFP2 as FRET acceptor. The fluorescence lifetime of BAK-mT2 was measured by Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) and the FRET efficiency was calculated with respect to the donor-alone condition. At least 35 cells were counted for each condition. (c) Cells were co-transfected with a vector expressing p40MET-mT2 as FRET donor and a vector expressing free SYFP2, BAK-SYFP2, or BCL-XL-SYFP2 as FRET acceptor. The fluorescence lifetime

of p40MET-mT2 was measured by TCSPC and the FRET efficiency was calculated with respect to the donor-alone condition. At least 40 cells were counted for each condition.

Figure 3. Evaluation of p40MET-induced apoptosis after inhibition of calcium exchanges between the ER and mitochondria

(a, b) MCF10A epithelial cells were starved overnight in a calcium-free medium or treated overnight with the calcium chelator BAPTA-AM (10 μ M) and transfected the next day with a vector expressing a GFP-tagged fragment. (c) MCF10A cells were transiently transfected with a vector expressing GFP, GFP-p40MET, or GFP-p40MET D1374N and treated or not with the IP3R inhibitor xestospongine-B (5 μ M). (a-c) Twenty-four hours after transfection, cells were fixed and processed for immunostaining with an anti-cytochrome C antibody to detect apoptotic cells. The percentage of GFP-positive cells releasing cytochrome C was determined. At least 100 cells were counted per well ($n=6$; \pm S.D.). (d-e) One day before transfection with a vector expressing a GFP-tagged fragment, MCF10A cells were transfected with a control siRNA or with a mixture of three siRNAs targeting the mitochondrial calcium channel MCU. Twenty-four hours later, (d) one part of the cells were lysed and extracts were analyzed by western blotting with an anti-MCU and an anti-GAPDH antibody. (e) For immunofluorescence, staining was performed with an anti-cytochrome-c antibody and nuclei were labeled with Hoechst. The percentage of transfected cells displaying cytochrome-c release was determined. At least 60 cells were counted per well ($n=3$; \pm S.D.). (f) HEK293 cells were transfected with a vector expressing a GFP-tagged fragment. The next day, the cells were incubated in Ca²⁺-free HBS solution and treated with 1 μ M Thapsigargin (Tg). The calcium concentration was determined by estimating the uncorrected 340nm/380nm fluorescence ratio of fura-2AM. At least 20 cells were measured per condition ($n=3$; \pm S.D.). The presented results are representative of three independent experiments. Black arrows indicate Tg injection. (g) HEK293 cells were co-transfected with the 4mtD3cpv biosensor and a plasmid encoding either GFP or GFP-p40MET. The CFP fluorescence lifetime was recorded and the FRET efficiency, indicative of the calcium level in the mitochondria, was calculated with respect to the level observed for the control, set at 100%. At least 30 cells were counted for each condition. ($n=3$; \pm S.D.). Below, schematic representation of the 4mtD3cpv biosensor constituted by two fluorescent probes linked by a calmodulin binding site, allowing FRET measurement (h) MCF-10A epithelial cells were transiently transfected with a vector expressing Flag-p40MET and were treated or not with 2.5 μ M cyclosporinA (CSA). Twenty-four hours after transfection, the nuclei were stained with Hoechst and immunofluorescence staining was performed with an anti-Flag antibody and an anti-cytochrome c antibody. The percentage of MET-transfected cells displaying cytochrome c release was determined.

At least 200 cells were counted per well (n=3; \pm S.D.). ns, non significant; *, P<0.05; **, P<0.01 as determined by Student's *t* test.

Figure 4. Generation of MET knock-in mice mutated at the C-terminal caspase cleavage site and Isolation of hepatic progenitors

(a) Strategy for generating knock-in mice. The targeted MET allele is depicted. White boxes represent *met* exon 22 with, in red, the generated knock-in (KI) mutation GAT>AAT (D1374N). Bold black arrowheads indicate LoxP sites. The positions of the genotyping primers are marked with thin black arrows. (b) To confirm the presence of the KI mutation in *met* exon 22, PCR genotyping was performed with primers flanking the loxP sites and amplifying a 476-bp of the wild-type allele (WT) and a 563-bp fragment of the *met* KI allele (D1374N). (c) Levels of *KRT19*, *HFN4a*, *ALDOB*, and *ALB* transcripts were measured by RT-qPCR Bipotential Mouse Embryonic Liver cell (BMEL) clones derived from WT and MET D1374N mice, and murine hepatocytes as a control. Analyses of two WT BMEL clones (Clones A and B) and two D1374N clones (clones A and B) are shown. The results presented are averages of three independent experiments, with errors bars showing standard deviations. (d) BMEL cells cultured under routine conditions and were counted after 24, 48, or 72h and the doubling times of the WT and MET D1374N BMEL cells were established by averaging the values obtained for the two corresponding clones. (e) Cells were seeded at low confluence. The next day the cells were starved for 30min in the presence or absence of 10ng/ml HGF/SF. Representative pictures were taken after 24h; scale bar = 100 μ m (f) BMEL cells were starved overnight in RPMI-0% FCS and stimulated or not for 10min with 20ng/ml HGF/SF. For each condition, the same amount of whole cell lysate was analyzed by western blotting with antibodies against mouse MET, ERK, AKT, and their phosphorylated forms. (g) BMEL cells were treated for 7h with 1 μ M staurosporine (STS) with or without the pan-caspase inhibitor zVAD-FMK or Q-VD (20 μ M). The same amount of protein was resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with antibodies against the MET kinase domain and cleaved PARP, to assess apoptosis induction, and GAPDH, to assess loading.

Figure 5. Comparison of WT and MET D1374N BMEL cell death

(a) Representative pictures of BMEL cells (clones WT-A and D1374N-A) cultured for 1, 2, and 3 days (d1, d2 and d3) without a collagen coating; scale bar = 100 μ m (b-c) BMEL cells were cultured for 24h on a (b) Petri dish or (c) an ibidi slide, both coated with poly-L-lysine, and treated for 4h with 1 μ M staurosporine. (b) For each condition, the same amount of whole-cell lysate was analyzed by western blotting with antibodies against cleaved caspase 3, PARP1, and GAPDH. (c) Cells were fixed and immunofluorescence staining was performed with anti-cleaved caspase 3 antibody. Nuclei were

stained with Hoechst. At least 200 cells per well were counted and the percentages of cleaved-caspase 3 positive cells, averaged over three independent experiments, are represented ($n=6$; \pm S.D.). (d) BMEL cells were cultured for 24h on an ibidi slide coated with poly-L-lysine and treated for 4h with 5 μ M xestospongine-B and 1 μ M staurosporine. Immunofluorescence staining was performed with an anti-cleaved caspase-3 antibody. The nuclei were stained with Hoechst. At least 80 cells per well were counted and percentages of cells displaying cleaved caspase 3 are shown ($n=3$; \pm S.D.) (e) BMEL cells (WT-A and D1374N-A) were treated for 4h with 1 μ M staurosporine to induce apoptosis. The mitochondrial Ca²⁺ uptake capacity of digitonin-permeabilized BMEL cells (250000/ml) was measured with a cytosolic calcium green Ca²⁺ probe upon addition of sequential Ca²⁺ pulses (black and gray arrows) to the medium in an O2K-oxygraph apparatus (Oroboros). (f) The measurements of three independent experiments on BMEL cells (500000 cells/ml) were averaged. ns, nonsignificant; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$ as determined by Student's *t* test. Black arrows = Ca²⁺ injection for WT and D1374N cells; gray arrows = Ca²⁺ injection for D1374N cells only.

Figure 6. Evaluation of hepatocytes apoptosis in WT and D1374N mice

(a) Pictures of newborn wild-type (WT) and MET D1374N mice; scale bar = 1cm (b) Pie chart representation of the proportions of WT, heterozygous (HT) and homozygous (HO) progeny obtained by crossing mice with different genotypes. (c) WT and MET D1374N mouse liver sections stained with hematoxylin/eosin, showing a hepatic lobule with a centro-lobular vein at the center; scale bar = 50 μ m (d) Example of hematoxylin/eosin and cleaved-caspase 3 staining (brown) in the livers of WT mice pretreated before the experiment with 100 μ l of 5mg/ml Crizotinib and then treated for 4h with Jo-2 antibody against FAS 4 μ g/20mg mouse weight); scale bar = 300 μ m (e) The data represent the distribution of liver-tissue cleaved-caspase 3 staining (scored from negative - to highly positive +++) in two populations of mice (WT and D1374N) pretreated with Crizotinib and treated for 4h with Jo-2. In each column, the number of mice obtaining each score is indicated. Statistical analysis applied to differences in negative (-) and positive (+, ++ and +++) staining between WT and D1374N. $P<0.05$ was determined by Fisher test (WT: $n=13$; D1374N: $n=15$).

Figure 7. Schematic representation of the MET pro-survival and pro-apoptotic pathways

In the presence of HGF/SF, MET receptor dimerizes and activates pro-survival signaling by activating the MAPK and PI3K/AKT pathways. In the absence of ligand, MET is cleaved by caspase 3 at a juxtamembrane and a C-terminal site to generate the p40MET fragment, which translocates to the MAM microdomain. p40MET may interact with BAK and promote deregulation of the Ca²⁺ flux between the ER and the mitochondria, causing mitochondrial permeabilization involved in

amplification of apoptosis. This dual role of MET classifies it as a dependence receptor. D1374N MET, mutated at the C-terminal caspase site, generates a slightly longer fragment that can no longer promote apoptosis. Upon stress induction by Fas activation in WT and D1374N mice, D1374N hepatocytes show less apoptosis. This suggests that C-terminal caspase cleavage of MET is important for optimal apoptosis *in vivo*.

Supplementary data

Figure S1: Validation of the vectors expressing GFP-p40MET and GFP-p40MET D1374N

(a) HEK 293 cells were transfected with a vector expressing GFP, GFP-p40MET, GFP-p40MET D1374N or Flag-p40MET. Twenty-four hours after transfection, the cells were lysed. The protein mixture was resolved by 4-12% SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies against the MET kinase domain, GFP, and GAPDH. (b-c) Representative pictures (Fig1b-c) of transfected cells immuno-labelled with a cytochrome-c or cleaved-caspase 3 antibody are shown. White arrows indicate transfected cells positive for cytochrome-c release or cleaved caspase 3; scale bar = 10 and 50µm. (d-e) MCF10A epithelial cells were transfected with a vector expressing GFP, GFP-p40MET, or GFP-p40MET D1374N. (d) Twenty-four hours after transfection, immunofluorescence staining was performed with anti-calnexin to label the ER (red staining) and the nuclei were stained with Hoechst (blue staining). The cells were observed by fluorescence confocal microscopy. (e) Twenty-four hours after transfection the mitochondria were stained with MitoTracker (red), fixed, and observed by fluorescence confocal microscopy.

Figure S2: Validation of the vectors expressing m-Turquoise2- or SYFP2-tagged proteins in FRET experiments

(a-b) HEK293 cells were transiently transfected with a vector expressing mTurquoise2- or SYFP2-tagged p40MET, BAK, BCL-XL, or IP3R1. Twenty-four hours after transfection, cells were (a) analyzed by fluorescence microscopy to check for expression of fluorescent proteins and (b) lysed. Extracts were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by western blotting with anti-GFP and anti-GAPDH antibodies.

Figure S3: Involvement of calcium flux in staurosporine-induced apoptosis

(a-c) MCF10A epithelial cells were starved overnight (a) in calcium-free medium or (b) in the presence of 10µM calcium chelator BAPTA-AM. The next day, they were treated for 6 h with 1µM staurosporine to induce apoptosis and (c) treated or not with IP3R inhibitor xestospongine-B. Immunofluorescence

staining was performed with an anti-cytochrome *c* antibody to detect apoptotic cells. Nuclei were detected with Hoechst. At least 100 cells were counted per well.

Figure S4: Culture phenotype of MEF and BMEL cells and responses of WT-B and D1374N-B clones to survival or apoptosis induction

(a) MEF cells were seeded in complete medium in gelatin-coated plates. The next day cells were exposed to anisomycin 50 μ M for 5h. Pictures were then taken and evidenced the presence of a greater proportion of rounded apoptotic cells in WT vs D1374N MEF cells. (b) Immunofluorescence against active caspase-3 was carried out under the same apoptotic induction conditions and quantified. (c) Representative pictures of BMEL cells WT and D1374N clone A and B. (d) Representative pictures of BMEL cells belonging to two WT clones (A and B) and two D1374N clones (A and B). (e) Cells were seeded at low confluence. The next day the cells were starved in the presence or absence of 10ng/ml HGF/SF. Representative pictures of WT-clone B and D1374N-clone B cells were taken after 24h. (f) BMEL cells (WT-B and D1374N-B) were starved over-night in RPMI-0% FCS and stimulated or not for 10min with 20ng/ml HGF/SF. For each condition, the same amount of whole cell lysate was resolved by 12% SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies against mouse MET, ERK, AKT and their phosphorylated forms. (g) Representative pictures of BMEL cells (WT-B and D1374N-B) cultured in RPMI-10% FCS without collagen coating; scale bar = 100 μ m.

Figure S5: Mammary gland organization in WT and MET D1374N mice

(a) Whole-mount morphology of WT and MET D1374N mammary glands. Pairs #5 of 3-month-old mice were harvested, laid over microscopy slides, and incubated overnight with Carnoy's fixative. Glands were subsequently stained with Carmine Alum stain, cleared with xylene, and mounted with Permount mounting medium. WT and MET D1374N mammary glands display similar organization, with comparable levels of branching morphogenesis in the whole gland volume.

Figure S6: Evidence of Crizotinib efficacy against HGF-induced survival

(a) WT BMEL cells were cultured on a 6-well plate coated with poly-L-lysine. The next day, they were treated or not for 4h with 1 μ M staurosporine, 20ng/ml HGF/SF, or 0.1 μ M Crizotinib. For each condition, the same amount of whole cell lysate was resolved by SDS-PAGE and analyzed by western blotting with antibodies against PARP1 and GAPDH.

Figure S7: Complete-panel illustration of cleaved-caspase 3 staining of liver slices

(a-b) Photographs of all mouse livers (WT and D1374N) stained with antibody against cleaved caspase 3. Mice were pretreated with Crizotinib 5 days, 2 days, and 1 day before the experiment and fulminant hepatitis was induced **(b)** or not **(a)** by Jo-2 injection (4 h). Scores determined according to the number of positive cells (from negative - to highly positive +++) are indicated on each picture; scale bar = 300 μ m.

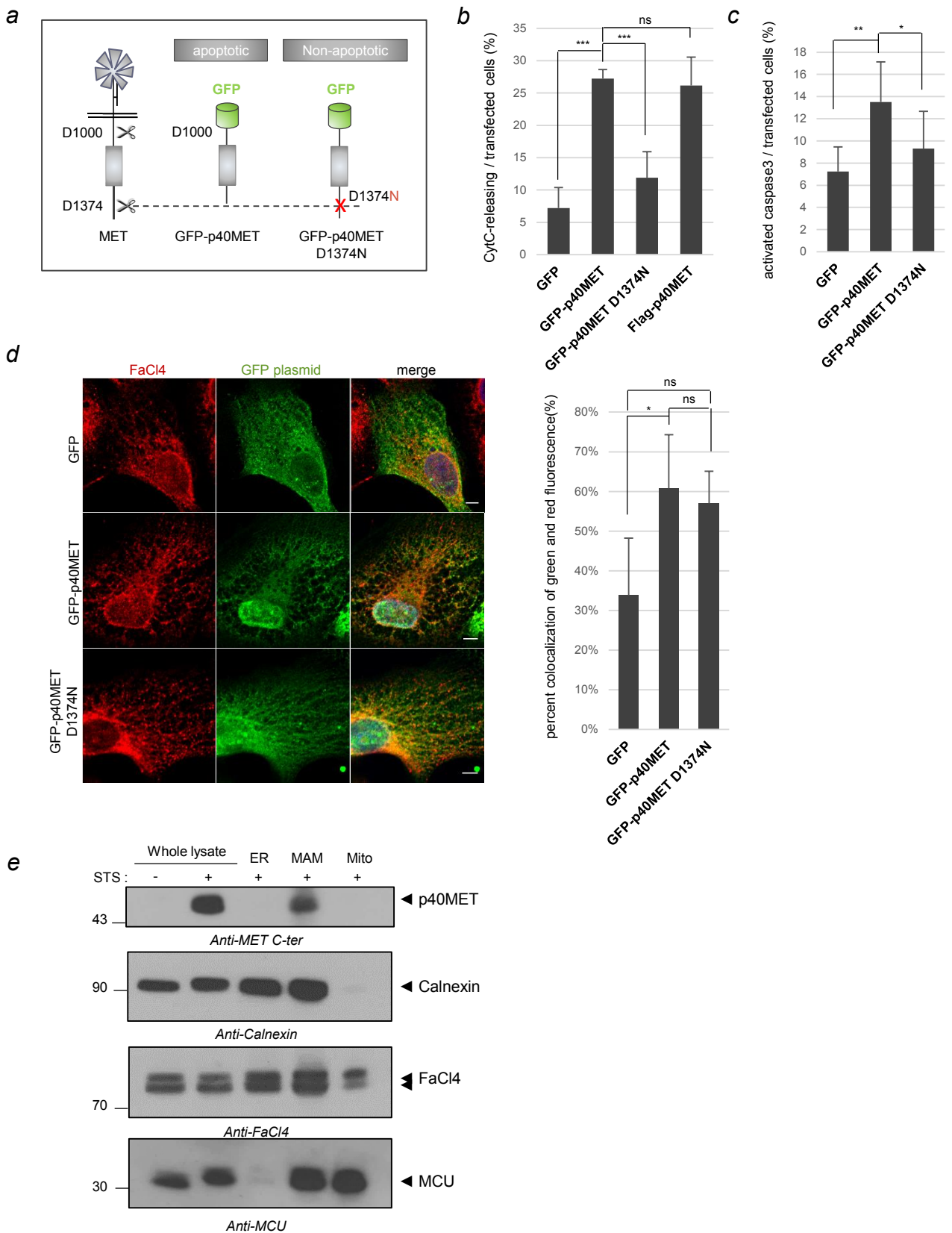


Figure 1. Sub-localization of p40MET fragment by immunofluorescence and fractionation

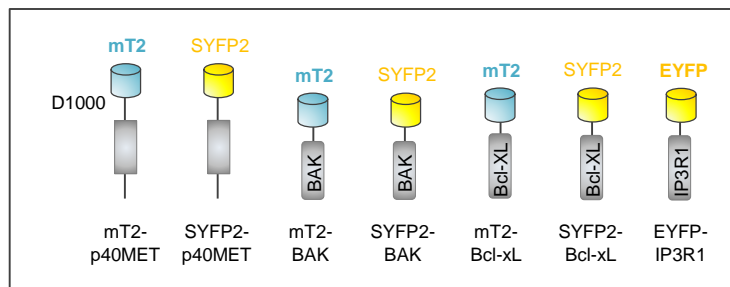
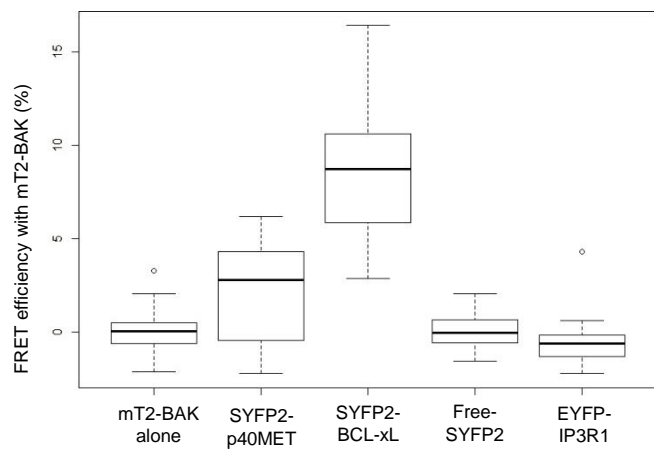
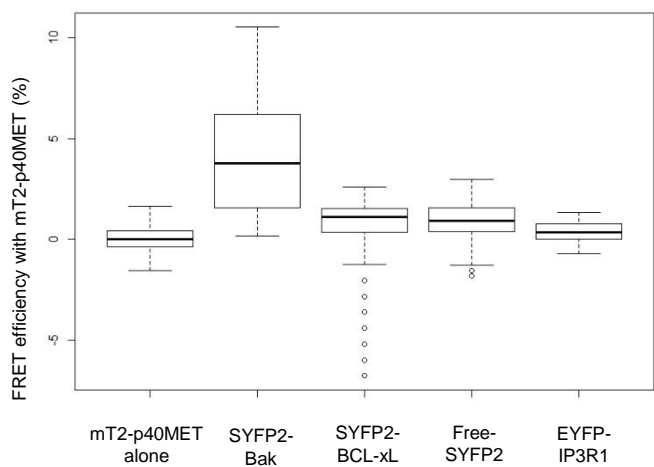
a**b****c**

Figure 2. FRET measurement to analyze p40MET and BAK interaction

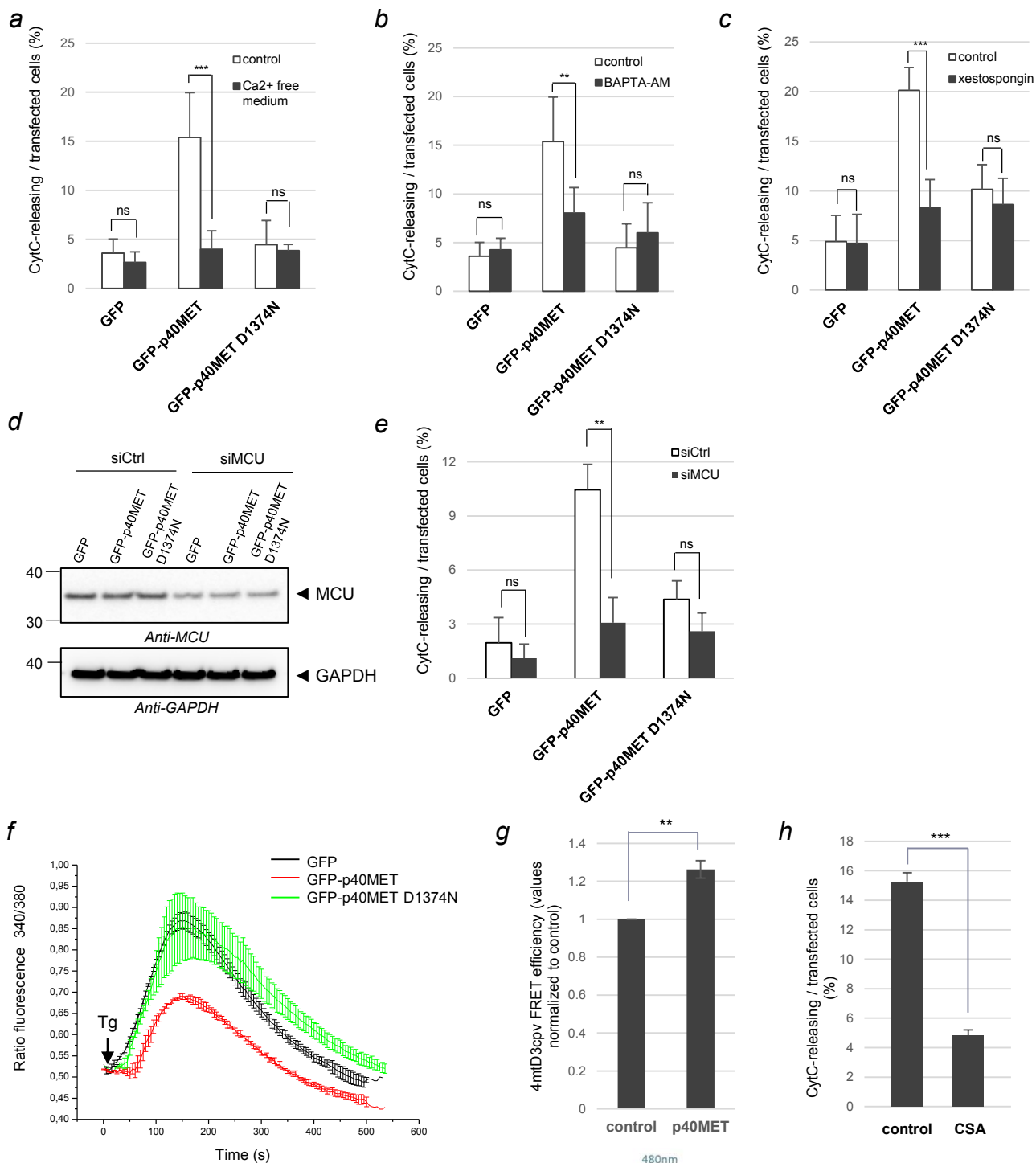


Figure 3. Evaluation of p40MET induced-apoptosis after inhibition of calcium exchanges between ER and mitochondria

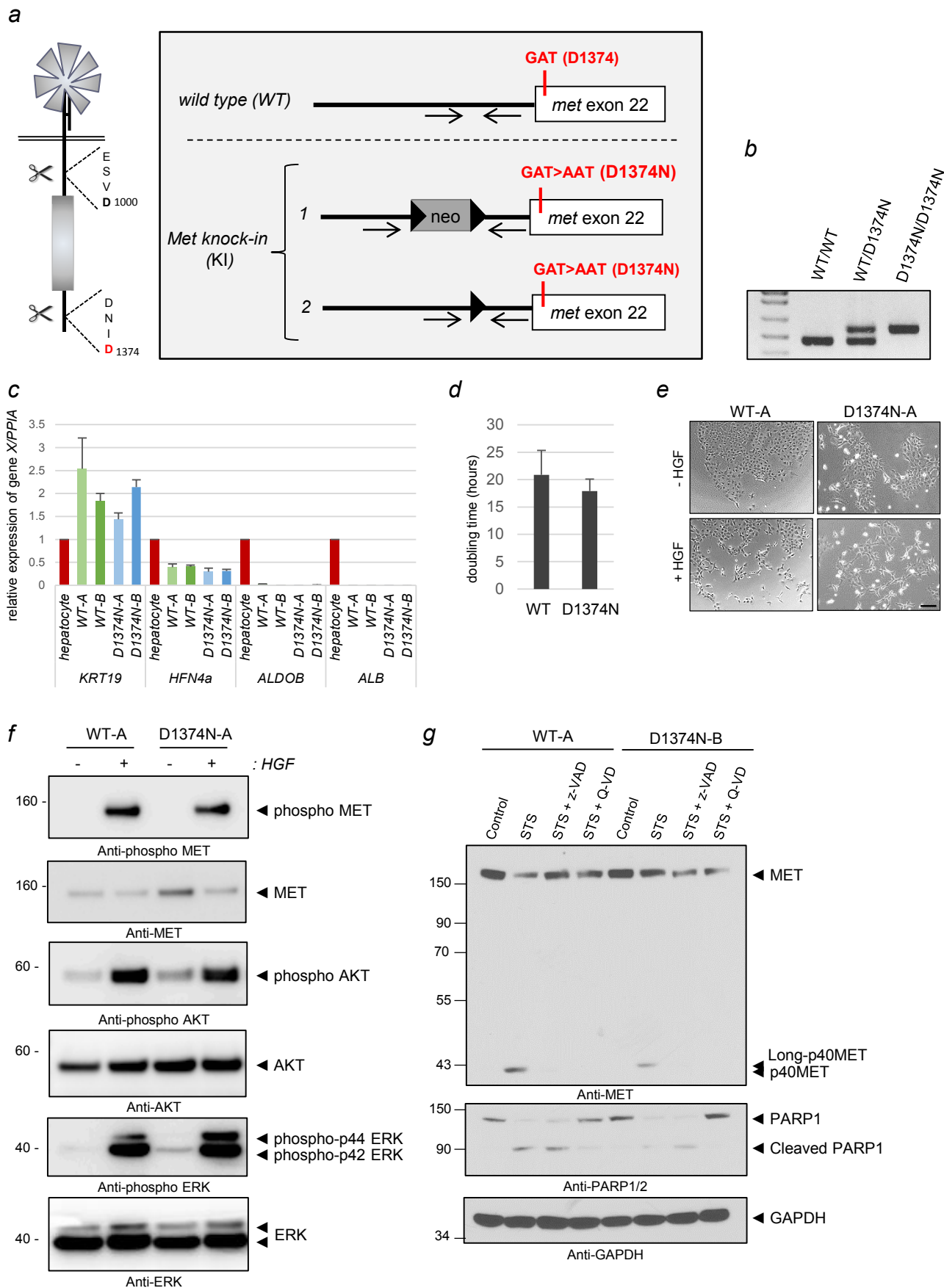


Figure 4. Generation of MET knock-in mice mutated on C-terminal caspase cleavage site and Isolation of hepatic progenitors

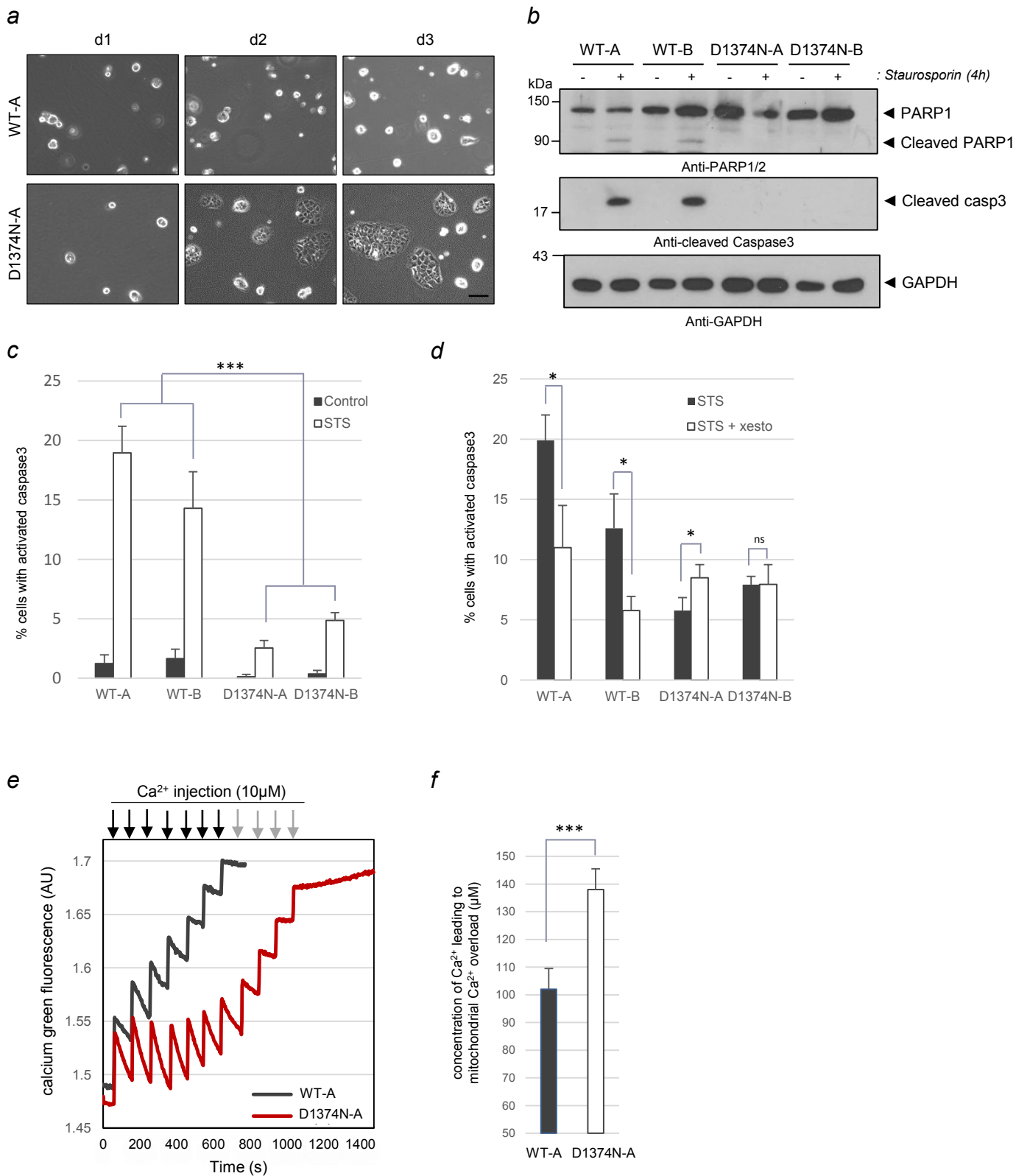


Figure 5. Comparison of the cell death between WT and MET D1374N BMEL cells

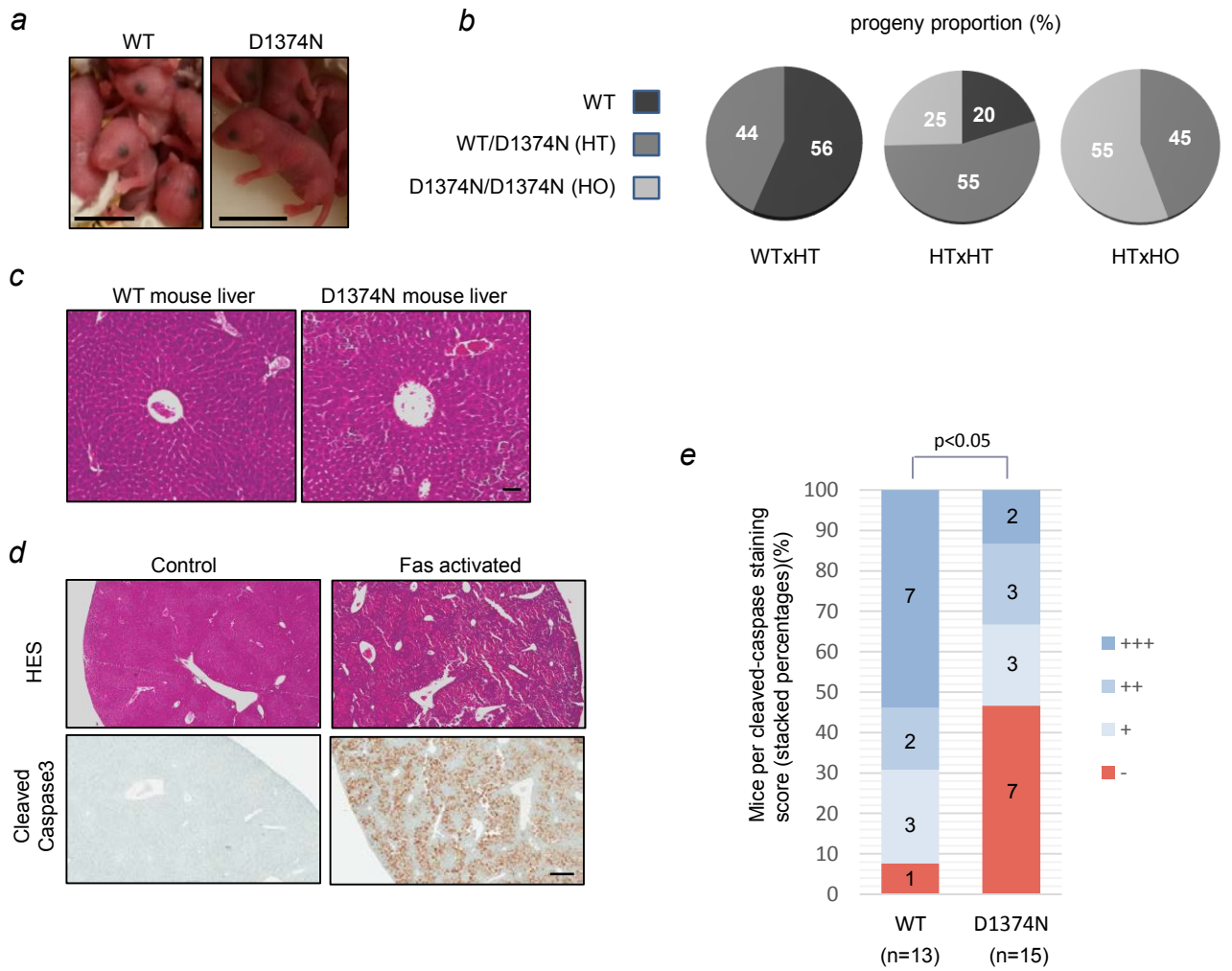


Figure 6. Evaluation of p40MET apoptosis amplification in vivo in a fulminant hepatitis model

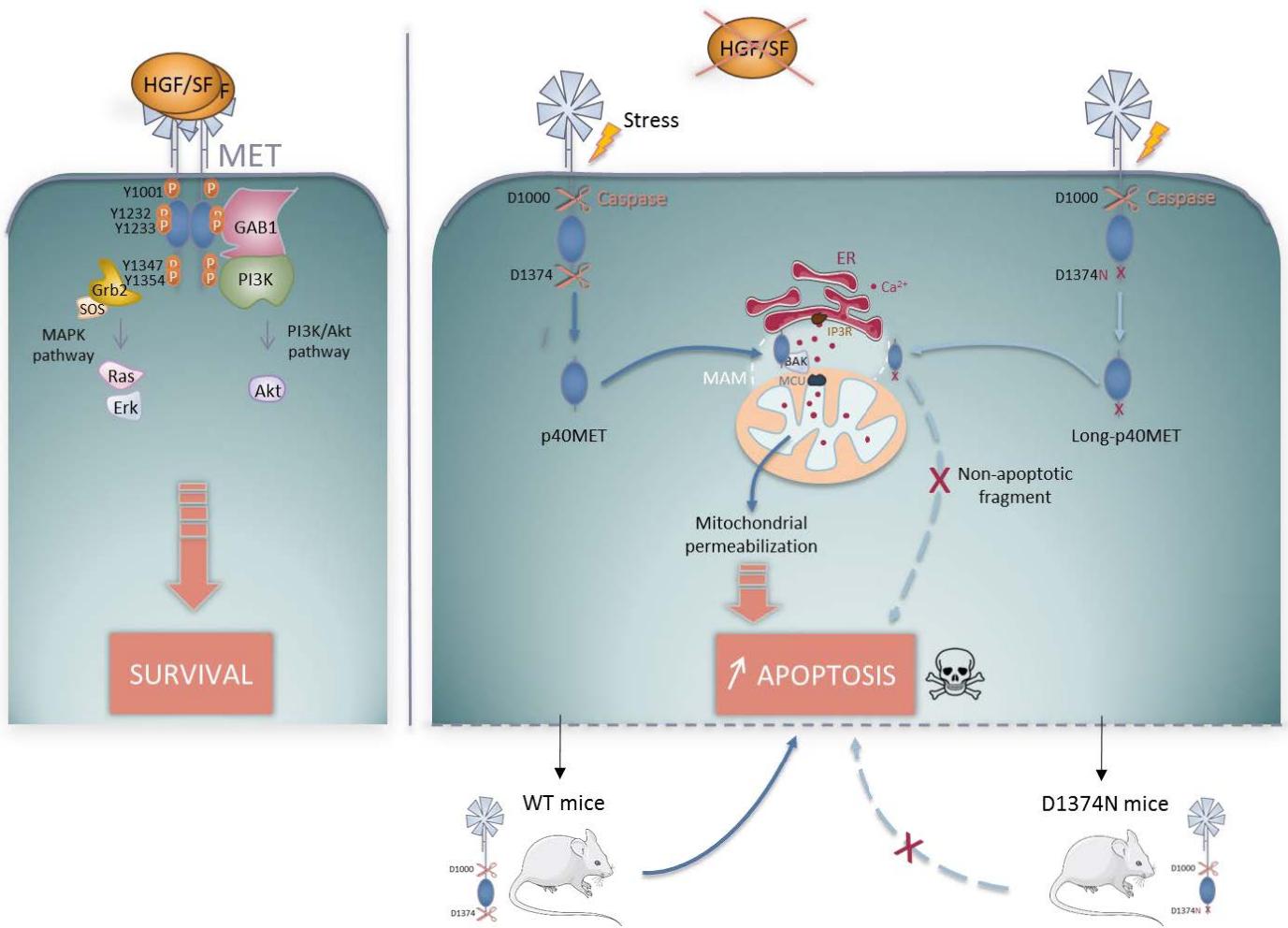
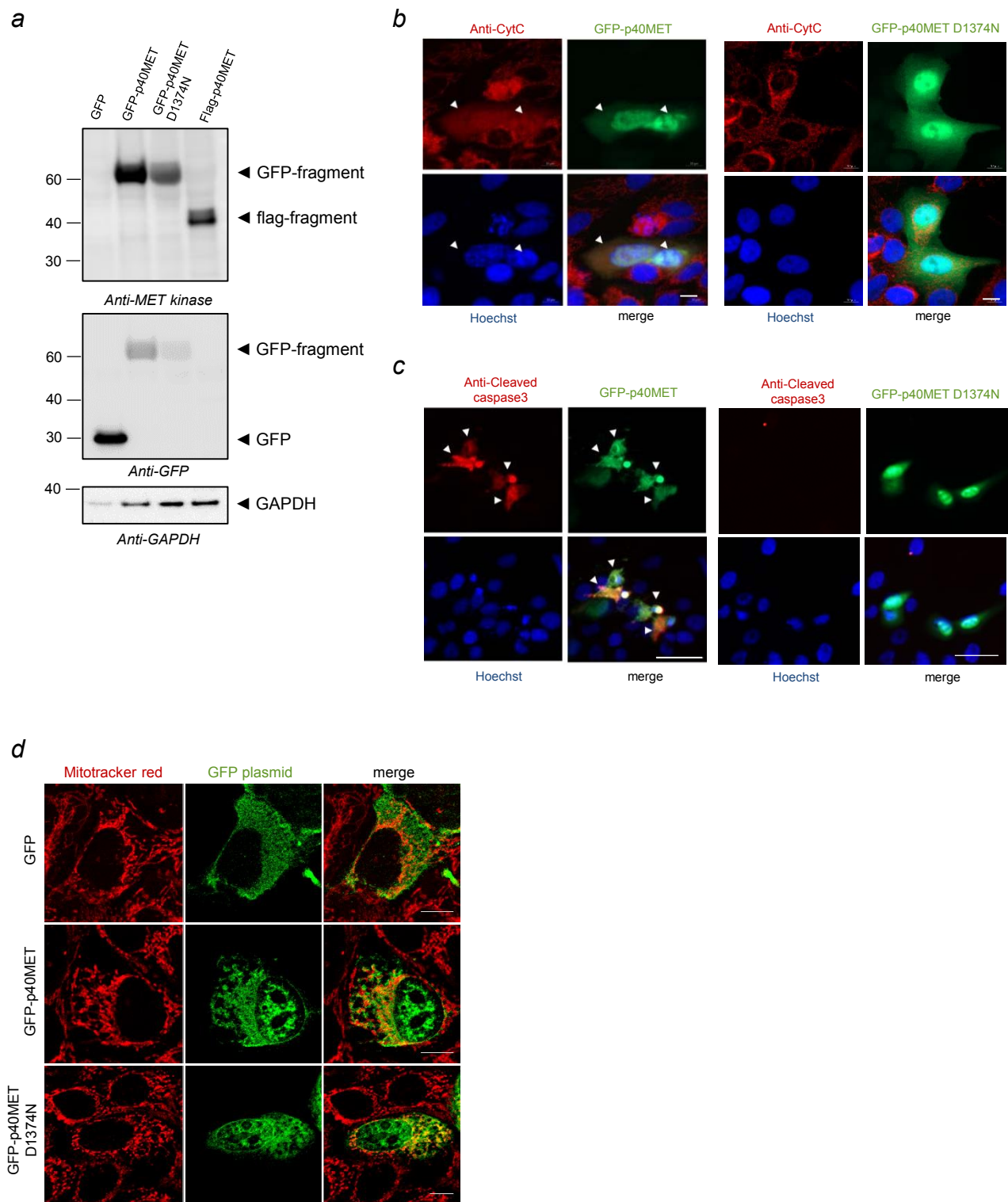
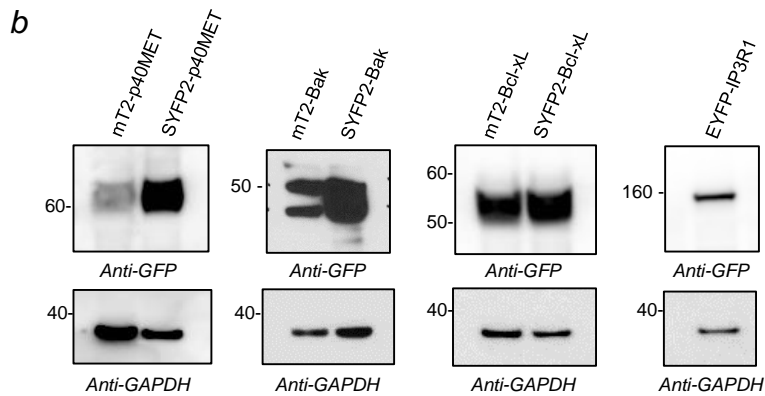
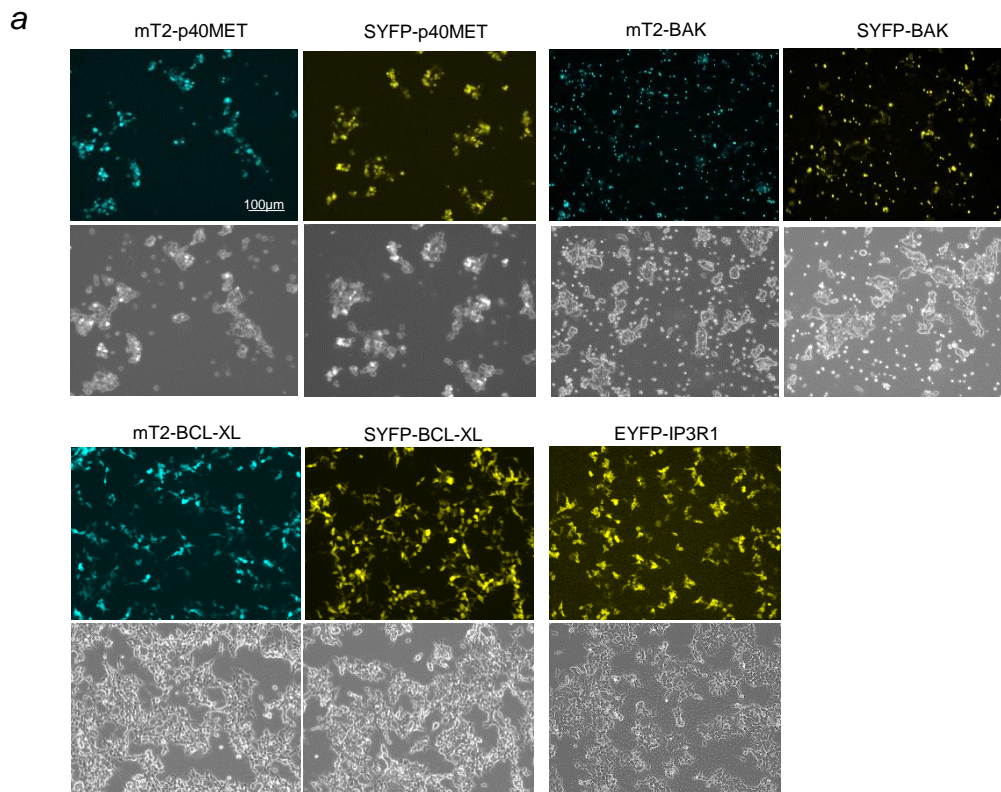


Figure 7. Schematic representation of MET pro-survival and pro-apoptotic pathways

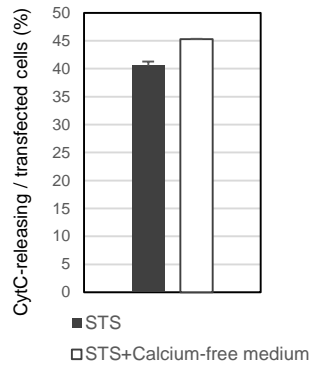


Suppl. Figure 1. Validation of the GFP-p40MET and the GFP-p40MET D1374N expressed proteins

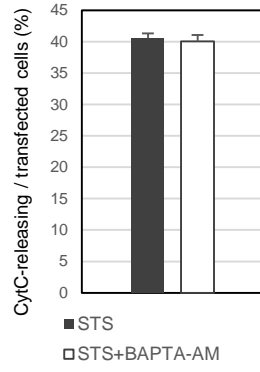


Suppl. Figure 2. Validation of the vectors expressing *m-Turquoise2*- or *SYFP2*-tagged proteins in FRET experiments

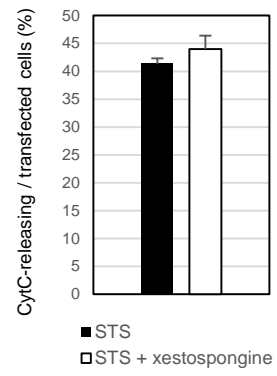
a

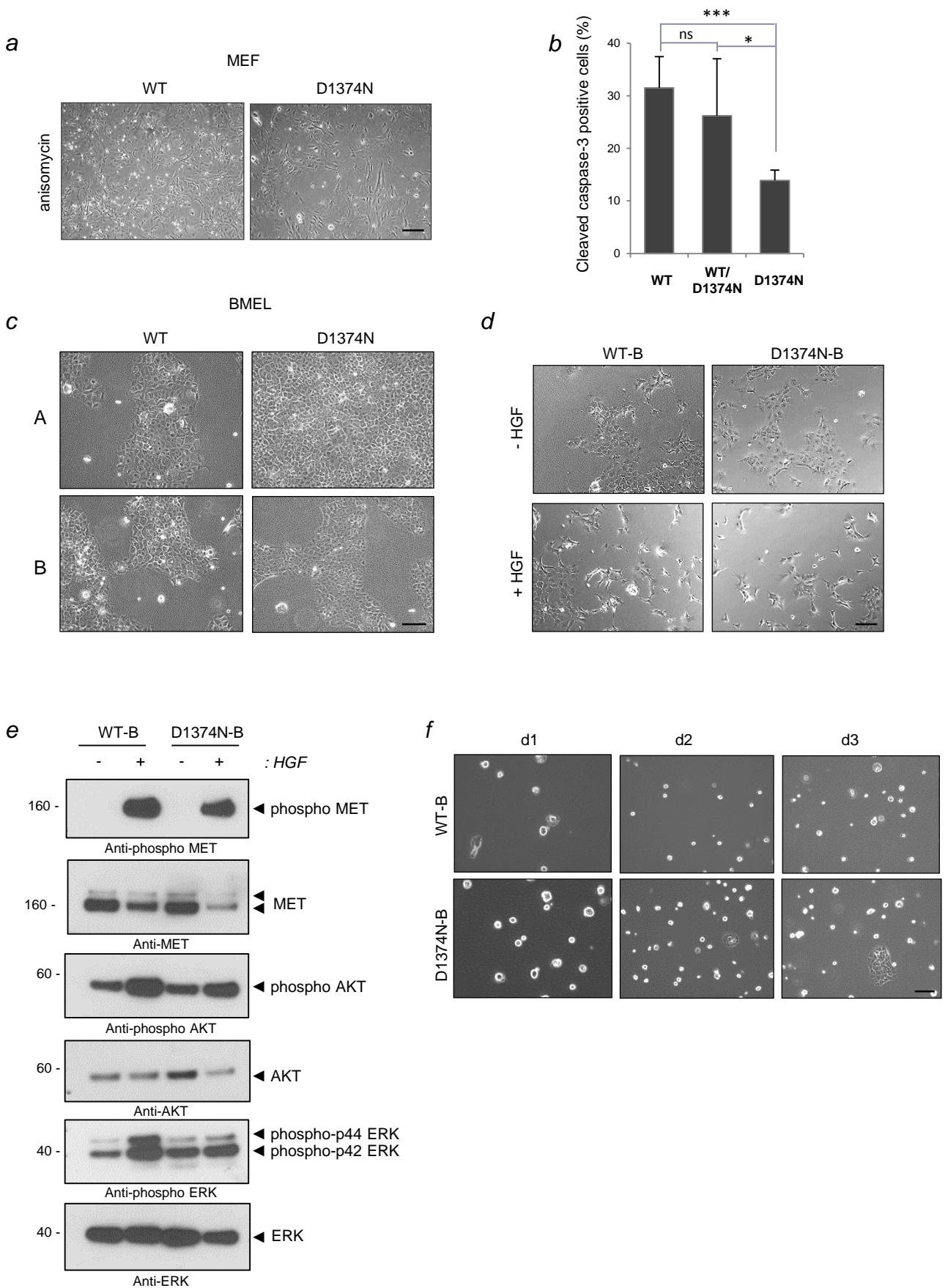


b



c



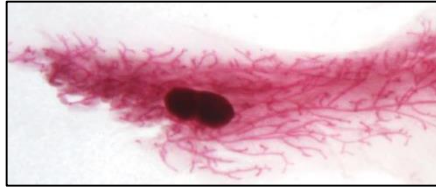


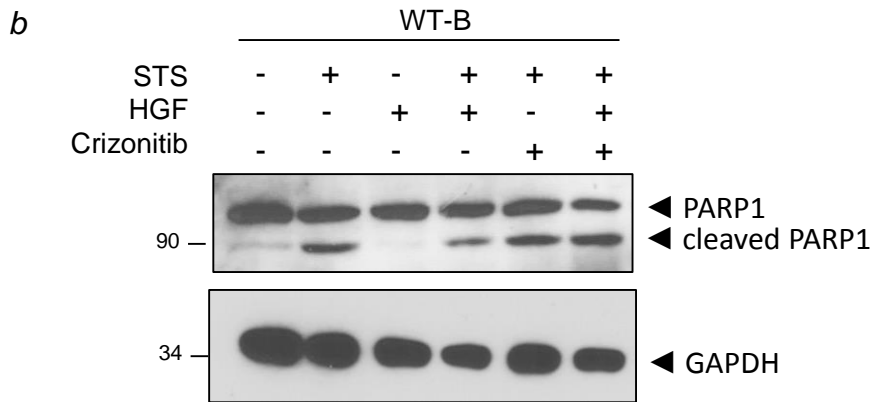
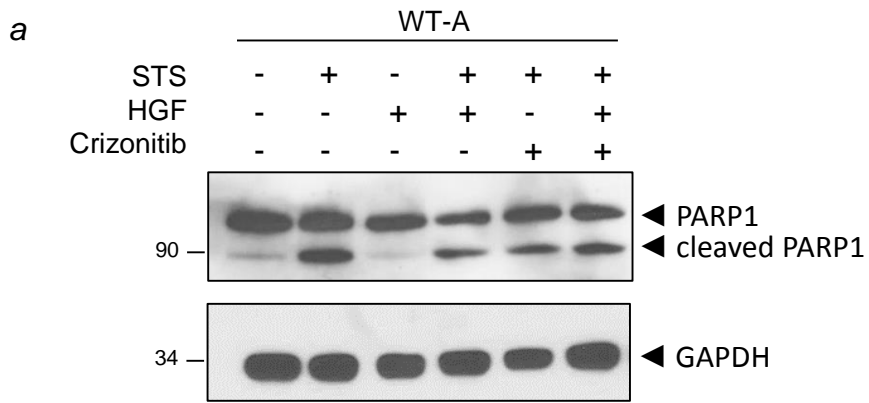
Suppl. Figure 4. Culture phenotype of MEF and BMEL cells and responses of WT-B and D1374N-B clones to survival or apoptosis induction

WT

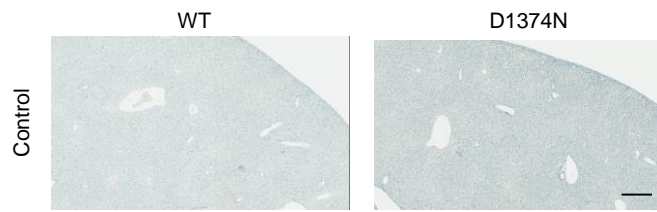


D1374N

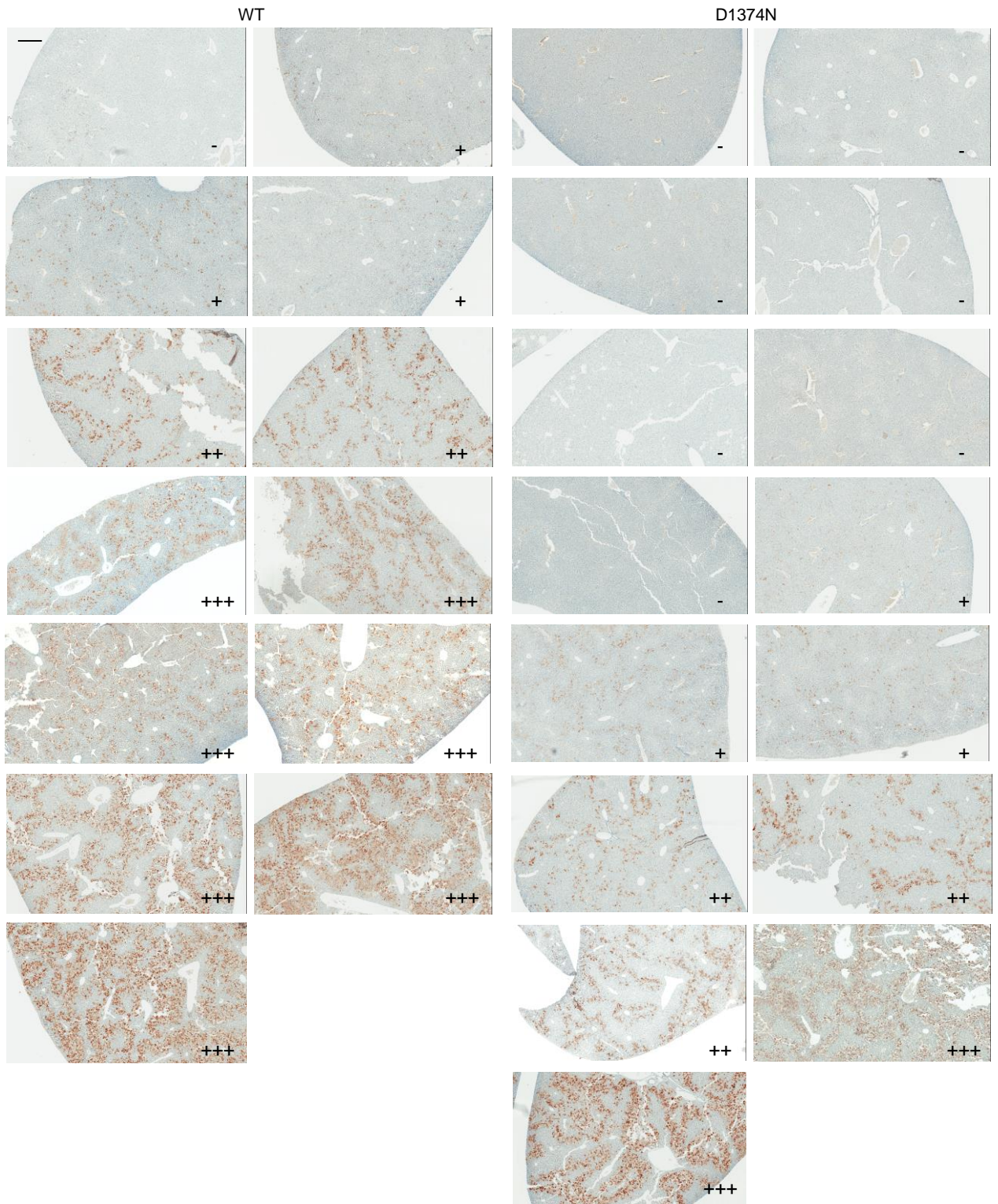




a



b



Suppl. Figure 7. Complete-panel illustration of cleaved-caspase 3 staining of liver slices

3. Résultats complémentaires

3.1 p40MET : présence d'un domaine BH3-like ?

Nous avons démontré dans l'article par la technique de FRET que p40MET peut interagir directement avec la protéine BAK. Dans la littérature, ont été décrites des protéines « BH3-like » qui sont capables d'interagir avec les membres de la famille BCL-2 et/ou possédant une activité pro-apoptotique et qui contiennent un domaine homologue au domaine BH3 de la famille BCL-2. En alignant la séquence p40MET humain et murin avec celles des protéines BH3-only, nous avons mis en évidence la présence d'un domaine BH3-like potentiel (Figure 22).

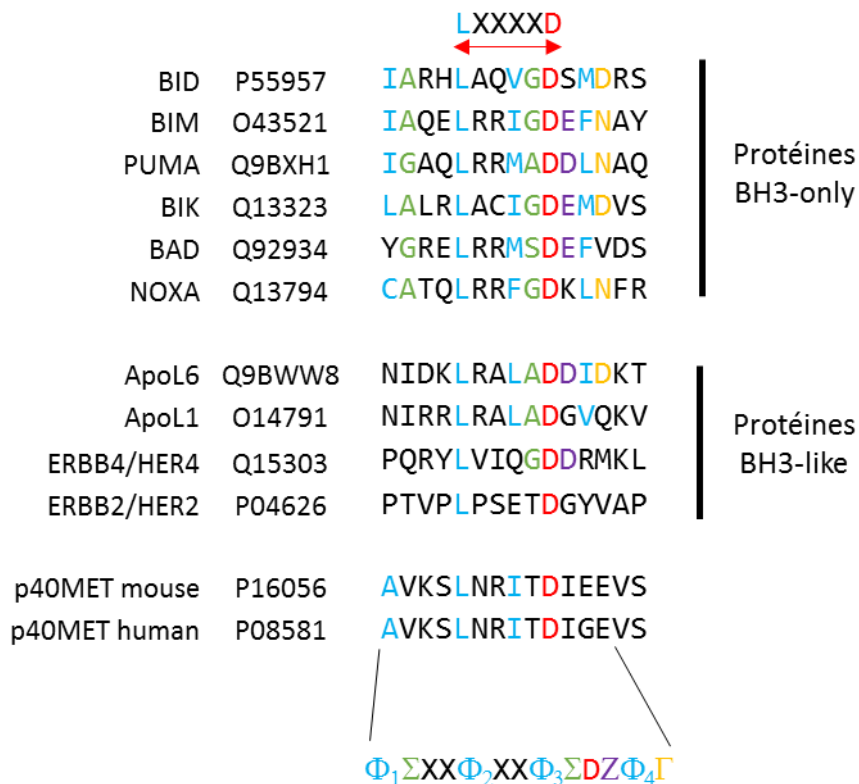


Figure 22 : Alignement des protéines de type BH3-only et BH3-like avec les séquences de p40MET murin et humain. Φ représente un résidu hydrophobe avec Φ_2 qui est la leucine du motif LXXXXD ; Σ est un petit résidu de type G, A, ou S ; Z est ordinairement un résidu acide ; Γ est un résidu hydrophile (N, H, D ou Y) tel qu'adapté de Day et al. (2008).

Cette séquence contient le motif LXXXXD (où X est un acide aminé quelconque) qui a été décrit comme le noyau du domaine BH3 car les résidus de leucine et d'acide aspartique semblent être très importants pour les interactions protéine-protéine et sont très conservés entre les membres BCL-2 (Lanave et al., 2004). Afin de déterminer plus clairement la séquence consensus du domaine BH3 une équipe a réalisé des analyses de séquence et de structure et a montré qu'il peut être décrit comme suit : $\Phi_1 \Sigma XX \Phi_2 XX \Phi_3 \Sigma D Z \Phi_4 \Gamma$, où Φ représente un résidu hydrophobe et Φ_2 la leucine du motif LXXXXD ; Σ

un petit résidu (G, A ou S) ; Z généralement un résidu acide (D ou E); et F un résidu hydrophile (N, H, D ou Y) (Day et al., 2008). En comparaison, p40MET présente une similitude de séquence avec 4 résidus correspondant au site consensus puisqu'il contient la séquence $\Phi_1XXX\Phi_2XX\Phi_3XDXXX$ dont le fameux motif LXXXXD (écrit $\Phi_2XX\Phi_3XD$). La présence d'un site BH3-like pourrait être responsable de l'interaction observée entre p40MET et BAK par FRET. Pour valider cette hypothèse des expériences complémentaires seront nécessaires et seront abordées par la suite.

Nous avons ensuite déterminé l'implication de ce site BH3-like potentiel dans le processus d'amplification de l'apoptose induite par p40MET. Pour cela nous avons muté le motif $L_{1110}XXXXD_{1115}$ en $N_{1110}XXXXN_{1115}$ à partir du plasmide exprimant le fragment GFP-p40MET par mutagenèse dirigée. Nous avons ensuite transfecté le plasmide GFP-p40MET et GFP-p40MET-LD (muté $N_{1110}XXXXN_{1115}$), dans des cellules épithéliales MCF10A, afin de comparer leur capacité à amplifier l'apoptose. Le pourcentage d'apoptose a été mesuré en évaluant par immunomarquage le nombre de cellules présentant une libération du cytochrome C (Figure 23A) ou une activation de la caspase 3 (Figure 23B) parmi les cellules transfectées. Ainsi, nous constatons que plus de 25% des cellules exprimant le fragment GFP-p40MET présentent une libération du cytochrome C, reflétant la perméabilisation de la membrane mitochondriale, contre environ 7% des cellules exprimant la version de p40MET mutée sur le site BH3-like potentiel. De la même manière, plus de 15% des cellules GFP-p40MET positives expriment la caspase 3 active contre environ 2% des cellules GFP-p40MET-LD. En conclusion, les résultats montrent que la mutation du site BH3-like potentiel de p40MET, au niveau des acides aminés les plus conservés que sont la leucine et l'acide aspartique du site LXXXXD, empêche p40MET de favoriser l'apoptose.

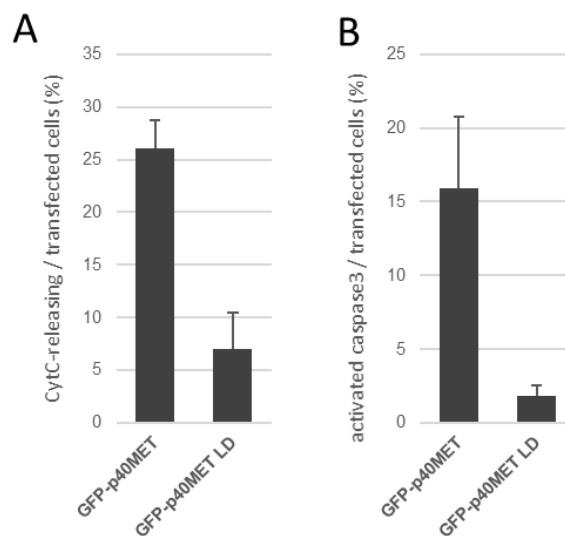


Figure 23 : Mesures de l'apoptose induite par le fragment p40MET-LD muté sur le site BH3-like. (A,B) Les cellules épithéliales MCF10A ont été transfectées de façon transitoire avec un vecteur exprimant GFP-p40MET ou GFP-p40MET-LD. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été fixées et marquées avec un anticorps anti-cytochrome C ou anticorps anti-caspase 3 clivée afin d'évaluer l'apoptose.

Le pourcentage de cellules présentant une libération du cytochrome C ou exprimant la caspase 3 active a été déterminé par rapport au nombre de cellules GFP-positives. Au moins 150 cellules ont été comptées par puits (n=9 ; ± S.D.).

Notre hypothèse est que la perte des capacités apoptotiques du fragment BH3-like muté est dû à sa perte d'interaction avec la protéine BAK. Nous souhaitons également déterminer si ce fragment va se localiser au niveau des MAMs, comme c'est le cas pour le fragment p40MET D1374N non apoptotique, ou si cette mutation empêche la relocalisation. Ainsi nous pourrions établir un lien entre l'interaction de p40MET-BAK et la relocalisation du fragment.

Afin de déterminer si la mutation du domaine BH3-like potentiel de p40MET empêche son interaction avec la protéine BAK nous avons développé des vecteurs permettant de réaliser des expériences de FRET comme il a été fait pour la publication précédente. Par cette technique, on peut mesurer des interactions moléculaires suite à un transfert d'énergie entre un « donneur » de photons et un « accepteur » qui sont respectivement fusionnés aux deux protéines dont on teste l'interaction. Pour ce faire, nous avons créé par clonage moléculaire les plasmides codants pour mTurquoise2 (mT2) ou Super Yellow Fluorescent Protein 2 (SYFP2) fusionnés à p40MET-LD. Dans un premier temps, nous avons validé nos constructions par séquençage (résultats non montrés) et l'expression de la protéine p40MET-LD taguée par microscopie et Western Blot (Figure 24). L'analyse par microscopie à épifluorescence montre que les fragments p40MET-LD couplés aux fluorophores mT2 ou SYFP2 sont détectables dès 24h de transfection (Figure 24A). De plus, les protéines issues de ces deux plasmides s'expriment à la taille attendue d'environ 70 kDa, correspondant aux 40 kDa de la protéine p40MET combinés aux 30 kDa des fluorochromes (Figure 24B). Les plasmides pourront donc être utilisés pour réaliser les expériences de FRET entre p40MET-LD et BAK. L'étude de la localisation du fragment p40MET-LD sera réalisée suite à des transfections transitoires dans des cellules épithéliales du plasmide codant pour le fragment GFP-p40MET-LD puis qui seront fixées puis immunomarquées avec un anticorps contre la FaCl4, une protéine fortement exprimée au niveau des MAMs.

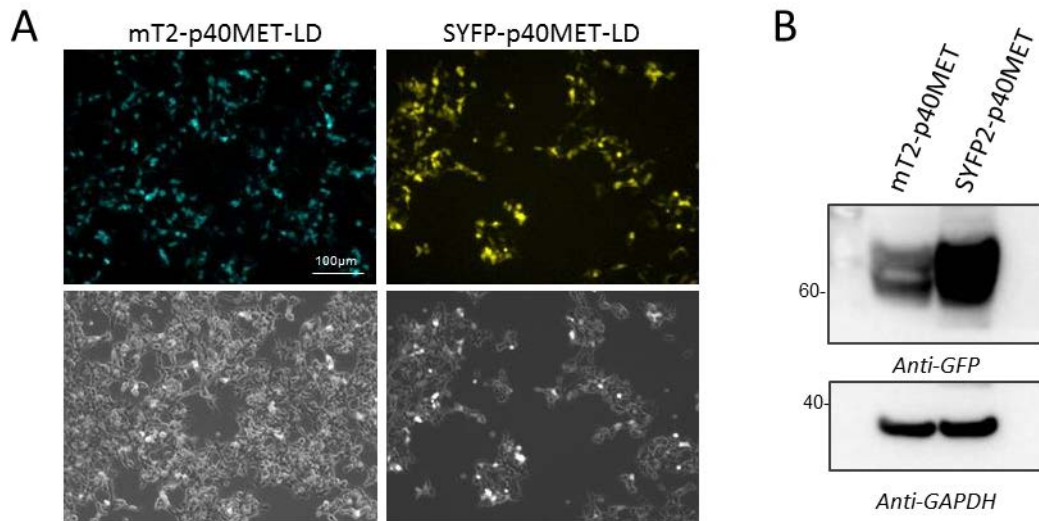


Figure 24 : Validation des vecteurs exprimant la protéine p40MET-LD marquée m-Turquoise2 ou SYFP2. (A,B) Les cellules HEK293 ont été transfectées de façon transitoire avec un vecteur exprimant p40MET-LD associé aux protéines fluorescentes mTurquoise2 ou SYFP2. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été (A) analysées au microscope à fluorescence pour vérifier l'expression des protéines fluorescentes et (B) lysées. Les extraits ont été déposés sur un gel SDS-PAGE 10% et analysés par l'utilisation d'anticorps anti-GFP et anti-GAPDH.

3.2 Les voies de stress du RE

Sous l'effet d'un stress perturbant l'homéostasie cellulaire, le RE est capable de relarguer une partie de son stock calcique. L'un des mécanismes pouvant favoriser la sortie du calcium est l'induction de la voie UPR (*unfold protein response*). J'ai étudié si p40MET était capable d'activer cette voie. La voie de l'UPR regroupe l'activation de 3 protéines transmembranaires résidentes du RE qui vont activer 3 voies distinctes : ATF6 (*activating transcription factor 6*), PERK (*PRK-like ER kinase*) et l'IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*). En condition d'homéostasie, ces protéines sont maintenues inactives par l'action d'une protéine chaperonne Grp78 (*glucose-regulated protein, 78kDa*). Lors d'un stress, la Grp78 se dissocie de ces protéines qui deviennent alors actives (Ron and Walter, 2007). ATF6 libéré va être clivé, se transloquer au noyau et agir comme un facteur de transcription favorisant l'expression de gènes impliqués dans la voie UPR tel que Grp78, Grp94 et CHOP (*CCAAT enhancer-binding protein homologous protein*) (Yamamoto et al., 2007). IRE1 et PERK sont, quant à elles, des protéines à activité kinase qui vont s'homo-dimériser et s'auto-activer en absence de Grp78. PERK va induire la phosphorylation inhibitrice de la protéine eIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor 2 α*), un facteur d'initiation de la traduction et va ainsi réduire le niveau global de traduction dans la cellule (Harding et al., 1999). De manière opposée, la phosphorylation d'eIF2 α induit aussi l'expression de CHOP et d'une phosphatase GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible gene 34*) qui va permettre la

déphosphorylation d'eIF2 α . Enfin, IRE1 va induire l'épissage de l'ARNm *XBP1* qui va agir comme un facteur de transcription (Yoshida et al., 2001).

J'ai alors analysé le taux d'ARN des facteurs CHOP, GADD34, Grp78 et Grp94 (résultants de l'activation des voies ATF6 et PERK) par RT-qPCR dans des cellules épithéliales transfectées transitoirement avec GFP-p40MET, la GFP seule ou un vecteur vide. Un contrôle positif a été réalisé en traitant les cellules avec la thapsigargin, un inhibiteur des pompes SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase*) qui sont responsables de l'entrée de calcium dans le RE. Ce traitement induit un stress du RE connu pour activer les voies de l'UPR. Les résultats ont été normalisés par un gène de référence *B₂M* (*β 2 microglobulin*) et sont exprimés par rapport à l'échantillon contrôle où le stress du RE n'est pas induit (Figure 25). Les résultats montrent que le traitement à la thapsigargin augmente le niveau d'expression des ARN des facteurs impliqués dans le stress du RE. Dans les cellules exprimant le fragment GFP-p40MET on observe une légère augmentation du niveau d'ARN pour les 4 facteurs mais comparable aux taux observés dans les cellules exprimant la GFP seule. Cette augmentation pourrait résulter du stress causé par la transfection. Nous avons également regardé par Western Blot l'apparition de la forme épissée de *XBP1* (témoin de l'activation de la voie IRE1), mais la qualité de l'anticorps ne nous a pas permis de conclure sur l'implication de la voie IRE1. Pour l'instant nous pouvons conclure que la sortie de calcium induite par p40MET ne semble pas impliquer les voies ATF6 et PERK de l'UPR.

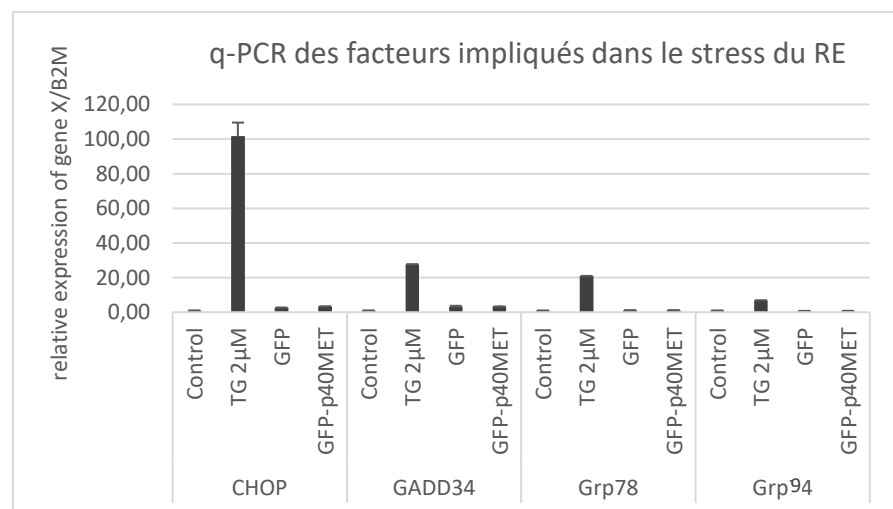
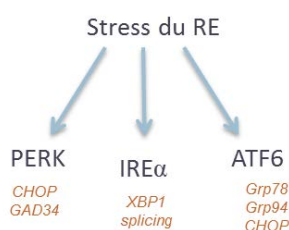


Figure 25 : Analyse par RT-qPCR des facteurs impliqués dans les voies PERK et ATF6 du stress du RE. Les niveaux des transcrits *CHOP*, *GADD34*, *Grp78* et *Grp94* ont été mesurés par RT-qPCR dans des cellules épithéliales MCF10A traitées à la thapsigargin (TG) (2 μ M) ou transfectées avec les plasmides GFP, GFP-p40MET ou un vecteur vide (control). L'expression relative des gènes est réalisée par rapport au niveau d'expression de l'échantillon contrôle provenant des cellules transfectées avec le vecteur vide dans le même échantillon ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Les gènes cibles ont été normalisés par la mesure du gène de référence *B2M*.

4. Discussion

4.1 Les localisations du fragment p40MET

La fonction d'une protéine est étroitement liée à sa localisation et à ses partenaires moléculaires. Ceci est bien illustré par le récepteur MET. Alors que sa forme pleine longueur est située au niveau de la membrane plasmique et permet la réponse au ligand, le clivage de MET par les caspases, en l'absence de son ligand, libère un fragment intracellulaire capable d'amplifier l'apoptose.

La localisation de p40MET au niveau des MAMs

Dans cette étude, nous avons utilisé les techniques d'immunofluorescence et de fractionnement subcellulaire pour démontrer que le fragment p40MET se localise au niveau des MAMs, un microdomaine où le RE est juxtaposé aux mitochondries. De plus en plus de travaux démontrent que ce microdomaine, initialement décrit comme étant un lieu de synthèse lipidique, est impliqué dans divers processus cellulaires, y compris dans les échanges intra-organelles de Ca^{2+} . Le rapprochement des membranes au niveau des MAMs favorisent le transfert de Ca^{2+} depuis le RE vers les mitochondries par le canal IP3R à la membrane du ER et par les canaux VDAC et MCU situés respectivement sur les membranes mitochondriales externe et interne (Csordás et al., 1999; Rizzuto et al., 1998). Les échanges de calcium entre le RE et les mitochondries contrôlent divers processus cellulaires, dont le métabolisme et la régulation de l'équilibre survie/apoptose (Rizzuto et al., 2012). Par exemple, l'entrée massive de calcium dans les mitochondries conduit à l'ouverture du mPTP, permettant la libération du contenu mitochondrial comprenant des facteurs pro-apoptotiques. Nous montrons ici que l'inhibition des échanges calciques empêche l'apoptose induite par p40MET, puisque l'utilisation d'un milieu dépourvu de Ca^{2+} ou l'ajout d'un chélateur de calcium altère l'action pro-apoptotique de p40MET dans un modèle de cellule épithéliale. Nous avons obtenu les mêmes résultats en inhibant plus spécifiquement le canal IP3R responsable de la sortie de calcium du RE grâce à un inhibiteur spécifique, ou le canal MCU impliqué dans le passage de calcium vers la matrice mitochondriale par une approche siARN. De plus, par l'utilisation de sondes calciques de différentes affinités, nous avons montré que la surexpression de p40MET provoque une déplétion de calcium du RE et une augmentation de sa concentration dans les mitochondries. La localisation de p40MET au niveau des MAMs est donc en accord avec son action sur la voie apoptotique intrinsèque. Toutefois, nous ne savons pas quelle est l'action de p40MET au niveau des MAMs. L'une des hypothèses est que le fragment va permettre la sortie massive de calcium du RE qui sera à l'origine de son accumulation dans les mitochondries.

Depuis les années 2000, de nombreuses études montrent que les membres de la famille BCL-2 peuvent se localiser à cette interface, au niveau des mitochondries ou du RE, afin de contrôler

l'homéostasie calcique (Oakes et al., 2005; Pinton et al., 2000; Scorrano et al., 2003). Dans le cas des protéines de la famille BCL-2, il a été montré que les membres anti-apoptotiques comme BCL-2 et BCL-XL peuvent interagir directement avec les canaux IP3R afin d'induire une sortie de calcium de façon oscillatoire favorisant le métabolisme mitochondrial et ainsi la prolifération et la survie des cellules (Chen et al., 2004; Li et al., 2007; Monaco et al., 2012). Ces interactions, qui ont lieu au niveau du domaine BH4 de BCL-2 et BCL-XL, ont été mises en évidence par des techniques de GST pull down et de FRET (Monaco et al., 2012; Rong et al., 2008, 2009). A l'inverse, les membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2, tel que BAX et BAK, vont favoriser une libération massive et prolongée de calcium conduisant à une surcharge calcique mitochondriale et à la mort cellulaire (Nutt et al., 2002; Oakes et al., 2005). Cependant, alors que leur rôle sur la dérégulation des flux calciques est clairement établi, aucun article n'a montré une interaction directe avec le canal IP3R.

Dans le cas de p40MET, nous avons montré par la méthode de FRET que p40MET n'interagissait pas directement avec le canal IP3R. Or, comme c'est le cas pour BAX/BAK avec IP3R, le fait que nous ne voyons pas d'interaction ne signifie pas que p40MET n'a aucune action sur le canal. D'autre part, nous avons montré que p40MET était capable d'interagir avec le fragment pro-apoptotique BAK. Désormais, il convient de comprendre pourquoi l'interaction entre p40MET et BAK va amplifier le phénomène d'apoptose. Dans un premier temps, afin d'établir l'implication de BAK sur la modulation des flux calciques induite par p40MET nous souhaitons refaire les expériences avec la sonde calcique Fura2-AM mais en présence d'un siARN contre BAK. Ainsi, nous pourrions déterminer si l'absence de BAK empêche la sortie de calcium du RE induite par p40MET. On suppose également que la localisation du fragment p40MET vers les MAMs s'effectue par l'intermédiaire de protéines partenaires. Ainsi, nous cherchons à savoir si l'interaction entre p40MET et BAK permet de localiser p40MET au niveau des MAMs. Pour répondre à cette question nous réalisons des expériences d'immunomarquages de la FaCL4 dans des cellules transfectées avec les fragments p40MET-GFP et où l'expression de BAK est inhibée par siARN.

Une étude récente montre, qu'au niveau des MAMs, BAK forme un complexe multiprotéique avec BIK, DAPK1 (*Death-associated protein kinase*) et ERK1/2 (Mebratu et al., 2017). Ce complexe va avoir plusieurs actions. D'une part, la protéine BH3-only BIK va augmenter l'expression de BAK au niveau du RE, en le libérant de BCL-2, et aussi perturber l'interaction entre BCL-2 et IP3R provoquant ainsi une libération de Ca^{2+} du RE. Il peut également interagir avec la protéine ERK1/2 et bloquer sa translocation vers le noyau empêchant alors sa signalisation pro-survie (Mebratu et al., 2008). D'autre part, BAK peut interagir avec DAPK1 et conduit à son ancrage au niveau du RE. Ainsi localisé, DAPK1 va

rapprocher et augmenter les zones de contacts entre le RE et les mitochondries facilitant les échanges calciques entre les organites. On peut alors imaginer que p40MET puisse agir au sein de ce super complexe protéique, *via* son interaction avec BAK.

La localisation de p40MET au niveau du noyau

Par ailleurs, on peut observer sur les images d'immunofluorescence que le fragment p40MET est aussi présent au noyau. Cette double localisation a déjà été retrouvée pour le fragment de clivage d'un autre récepteur à dépendance, le récepteur TrkC (Ichim et al., 2013; Ménard et al., 2018). Il a été démontré que le fragment pro-apoptotique TrkC-KF se localise à la mitochondrie où il favorise l'activation de BAX et la perméabilisation de l'OMM mais qu'il peut également se transloquer au noyau où il régule négativement la transcription de MDM2 (*mouse double minute2*) par une interaction avec le facteur de transcription HEY1. De la même façon que TrkC, p40MET nucléaire pourrait éventuellement interagir avec des facteurs de transcriptions afin de favoriser le processus apoptotique. Il y a peu de temps, un article a décrit un potentiel site NLS situé sur le domaine juxtamembranaire de MET et présent sur le fragment p40MET, composé de deux histidines séparées par 10 acides aminés. Il semblerait que ce site soit dépendant du pH, car une acidification intracellulaire favorise la translocation de MET vers le noyau (Chaudhary et al., 2014). Or, il a été montré qu'au cours de l'apoptose l'homéostasie du pH intracellulaire était modifiée (Lagadic-Gossmann et al., 2004) ce qui pourrait favoriser la translocation de p40MET vers le noyau.

D'autre part, une expérience de criblage double hybride nous a permis d'identifier TRIAD1 (*RING fingers and DRIL1*), une E3-ubiquitine ligase, comme partenaire potentiel de p40MET. Des études ont montré que cette protéine régule l'apoptose dans plusieurs types de lignées cellulaires en favorisant la dissociation de p53 avec MDM2 (Bae et al., 2012; Jung et al., 2010). A l'instar de son action sur p53, il est possible que TRIAD soit présente dans le noyau lors du processus apoptotique où elle pourrait interagir avec le p40MET nucléaire. En conclusion, l'association p40MET/TRIAD pourrait, comme c'est le cas pour TrkC/HEY1, jouer un rôle sur la stabilité de la protéine p53. Enfin, il existe d'autres partenaires nucléaires connus comme étant capables d'interagir avec le récepteur MET et qui sont impliqués dans la régulation de l'apoptose. C'est le cas par exemple de la PARP1 qui est une protéine participant à la machinerie de réparation de l'ADN (Du et al., 2016). Des expériences complémentaires devront être réalisées pour déterminer si la localisation nucléaire du fragment p40MET a une fonctionnalité pro-apoptotique.

4.2 Le domaine BH3-like potentiel de p40MET est-il impliqué dans l'apoptose ?

Il existe plusieurs exemples attestant que les fragments de clivage des récepteurs à dépendance peuvent activer la voie intrinsèque de l'apoptose par l'intermédiaire des protéines de la famille BCL-2. Un premier exemple est le cas du récepteur TrkC, évoqué précédemment, dont le fragment de clivage produit en absence de ligand va promouvoir la perméabilisation de l'OMM en interagissant avec BAX par l'intermédiaire de la protéine COBRA1 (Ichim et al., 2013). Comme autre exemple, le récepteur ERBB2 (*Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2 ; HER2*) peut être clivé par les caspases, en absence de ligand, sur un ou deux sites générant un fragment cytosolique d'environ 47 kDa ou deux fragments de 22 et 25 kDa. Alors que le fragment de 22 kDa est dégradé par le protéasome, les fragments de 47 et 25 kDa sont localisés aux mitochondries où ils vont favoriser la perméabilisation mitochondriale en se liant à la protéine BCL-XL *via* leur domaine BH3-like et en l'inhibant (Strohecker et al., 2008).

Dans notre étude, nous avons démontré que le fragment de clivage de MET pouvait lui aussi interagir avec une protéine de la famille BCL-2. De façon intéressante, p40MET possède une séquence homologue au domaine BH3 des protéines de la famille BCL-2. Cette séquence BH3-like pourrait être impliquée dans son interaction avec BAK comme c'est le cas pour ERBB2/BCL-XL ou ERBB4/BAK (Naresh et al., 2006; Strohecker et al., 2008). Cependant, la seule présence d'une séquence homologue au domaine BH3 n'est pas suffisante pour affirmer qu'une protéine est BH3-like. Pour appuyer l'existence d'un domaine BH3-like sur p40MET j'ai repris les 6 éléments qui ont permis de prouver que ERBB2 était une protéine BH3-like (Strohecker et al., 2008). (i) L'expression ectopique de p40MET est suffisante pour induire l'apoptose de manière BAK-dépendante et caspase-dépendante (Lefebvre et al., 2013) ; (ii) cette induction de l'apoptose passe par la perméabilisation des mitochondries et la libération du cytochrome C ; (iii) le fragment p40MET (endogène et transfecté) est localisé aux MAMs, l'interface entre les mitochondries et le RE ; (iv) la comparaison, dans un modèle murin et de cellules primaires exprimant une version de MET WT ou muté sur le site de clivage C-terminal (D1374N), montre que la production du fragment p40MET sensibilise les cellules WT à une induction de l'apoptose par rapport aux cellules exprimant le fragment p40MET D1374N non apoptotique. Ces résultats suggèrent que c'est bien le clivage de MET qui promeut l'apoptose en libérant un produit apoptotique plutôt que la suppression de sa signalisation pro-survie en absence de ligand ; (v) la mutation du site BH3-like potentiel, au niveau des résidus les plus conservés que sont la leucine et l'acide aspartique (LXXXXD), ne permet plus au fragment p40MET d'induire l'apoptose (cf. résultats complémentaires) ; (vi) enfin, nous avons montré par FRET que p40MET pouvait interagir directement avec un membre de la famille BCL-2. Tous ces éléments sont en faveur de la classification de MET en tant que protéine BH3-like. Nous souhaitons étayer encore les arguments en réalisant une expérience de FRET pour vérifier l'absence d'interaction entre le fragment p40MET-LD et BAK. Dans le cas où la

mutation du site BH3-like potentiel de p40MET empêche son interaction avec BAK nous allons vérifier sa localisation subcellulaire.

En conclusion, le fragment pro-apoptotique issu du clivage de MET est capable d'induire la perméabilisation de la mitochondrie par une interaction directe avec un membre de la famille BCL-2 probablement *via* son domaine BH3-like.

4.3 MET, facteur d'amplification de l'apoptose ou récepteur à dépendance ?

La survie ou la mort des cellules exprimant des récepteurs à dépendance va être dépendante de la présence de leur ligand. Or dans le cas de MET, l'induction de sa signalisation pro-apoptotique n'est pas seulement dépendante de la présence ou non d'HGF.

Des expériences réalisées dans le laboratoire ont montré, dans des cellules exprimant p40MET de façon inductible, que la seule présence du fragment ne favorisait pas l'induction de l'apoptose. Il est nécessaire d'induire un stress supplémentaire, une initiation du processus apoptotique, pour que MET participe à l'apoptose. Nous avons pu constater que les souris KI, exprimant une version de MET incapable d'induire l'apoptose, sont viables et fertiles et qu'elles ne présentent pas d'anomalies de développement. Ces résultats suggèrent qu'en conditions physiologiques les capacités apoptotiques du récepteur MET ne seraient pas nécessaires au développement ou alors qu'elles peuvent être compensées par d'autres mécanismes. Cependant, l'induction d'une hépatite fulminante chez ces souris montre qu'elles sont plus résistantes à l'apoptose comparées aux souris WT suggérant que le clivage de MET est crucial *in vivo* pour exécuter un processus d'apoptose optimal dans le foie. En conclusion, MET jouerait un rôle d'amplificateur et non pas d'inducteur de l'apoptose comme la majorité des récepteurs à dépendance.

4.4 Rôle du clivage C-terminal de MET dans la régulation de la balance survie/apoptose

Le fragment p40MET résulte de deux clivages par les caspases du récepteur MET au niveau juxtamembranaire et au niveau C-terminal. Tandis que le clivage C-terminal ne va éliminer que quelques acides aminés (5 chez la souris et 10 chez l'homme), le clivage juxtamembranaire va permettre la libération du fragment dans le cytosol. Pourtant, notre étude démontre que la perte de la queue C-terminale est cruciale pour permettre à p40MET de favoriser l'apoptose *in vitro* et *in vivo*. Dans la littérature, une étude montre que ce petit peptide de 10 acides aminés, issu du clivage C-terminal, pourrait agir comme un inhibiteur de la caspase 3 (Ma et al., 2014). Un concept qui semble, au premier

abord, contredire nos résultats. L'étude démontre qu'en présence ou en absence d'HGF le fragment C-terminal de MET est libéré dans le cytosol où il favorise la survie cellulaire. Toutefois, ces résultats ne sont pas nécessairement en désaccord avec nos travaux. Notre hypothèse est que dans les premières étapes de l'apoptose, le fragment C-terminal de MET est libéré afin de protéger les cellules de l'apoptose. Si les signaux de survie ne sont pas suffisants pour contrecarrer l'activation des caspases, MET est clivé au niveau juxtamembranaire libérant ainsi le fragment p40MET pro-apoptotique (Figure 26). Ainsi, MET pourrait réguler la balance survie/apoptose par des mécanismes opposés dépendants du niveau d'activité des caspases (Furlan and Tulasne, 2014).

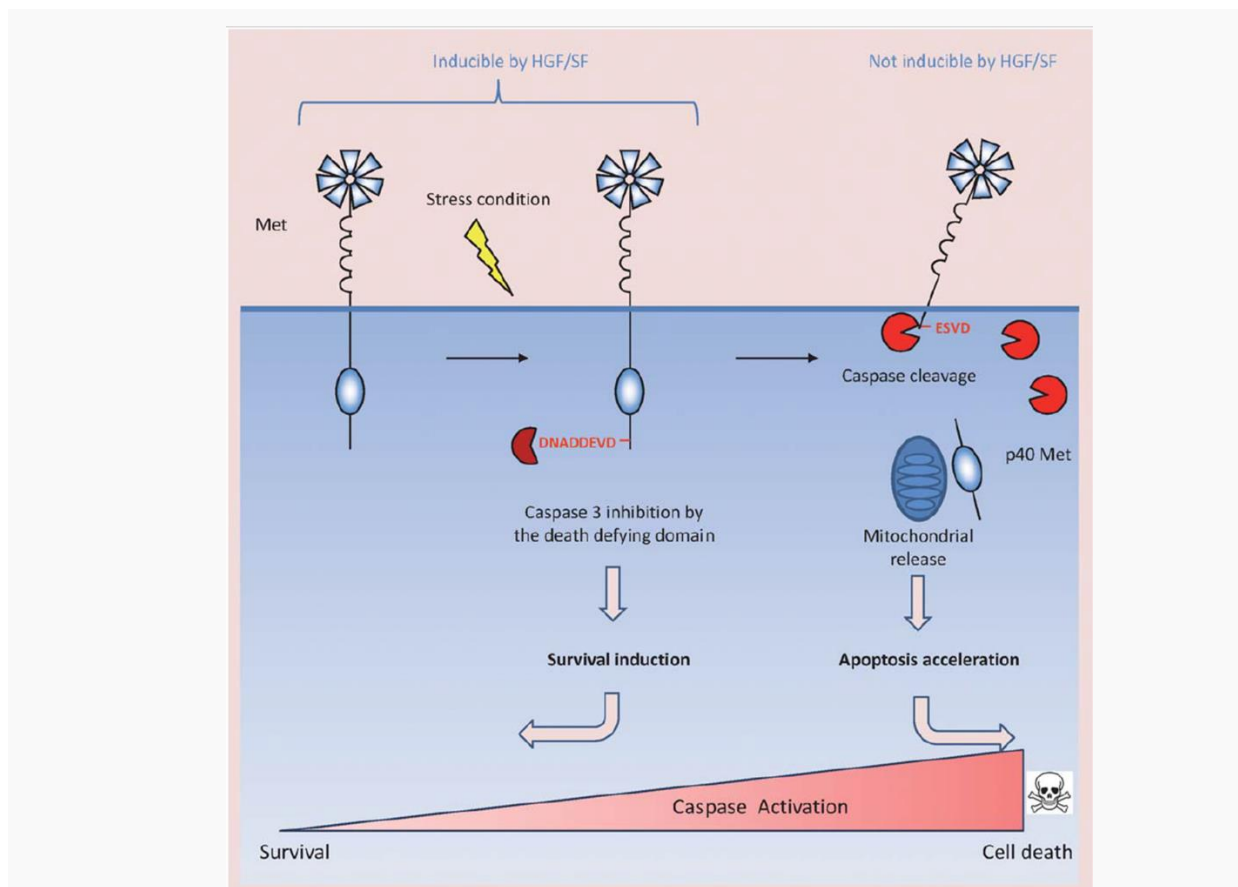


Figure 26 : Proposition du rôle du clivage C-terminal de MET dans la régulation de la balance survie/apoptose (Tiré de Furlan and Tulasne, 2014). Lors des premières étapes de l'apoptose, le clivage de MET par les caspases au niveau C-terminal peut inhiber l'action de la caspase 3 protégeant ainsi les cellules de l'apoptose. Dans les étapes plus tardives de l'apoptose, le pool de caspases activées est plus important et va conduire au clivage de MET au niveau juxta-membranaire, libérant dans le cytosol le fragment p40MET pro-apoptotique.

Toutefois, il est à noter que c'est le seul article à ce jour qui décrit cette capacité du récepteur MET à inhiber directement l'action des caspases. D'autre part, cette action n'existe pas pour le MET murin car la séquence C-terminale est différente du MET humain. Enfin, il n'existe à notre connaissance aucun autre exemple d'un petit peptide endogène issu d'un clivage par les caspases qui soit capable d'inhiber les caspases.

4.5 Rôle du complexe MET/Fas dans la régulation de la balance survie/apoptose

Le récepteur de mort Fas est exprimé dans de nombreux tissus et particulièrement dans le foie où il joue un rôle important dans l'homéostasie tissulaire. En présence de son ligand, le récepteur va s'homo-trimériser et activer la voie extrinsèque de l'apoptose. Toutefois, il est aussi connu que lorsque ces récepteurs sont surexprimés ils peuvent induire la mort des cellules indépendamment de leur ligand en s'activant par agrégation. Une étude a démontré que le récepteur MET peut se lier à Fas empêchant leur agrégation et l'induction de l'apoptose (Wang et al., 2002). Cette séquestration de Fas par MET n'est possible qu'en absence de leurs ligands respectifs. Dans cet exemple, l'absence de ligand de MET est favorable à la survie contrairement à ce que nous montrons dans notre étude. Cependant, comme nous l'avons vu, les capacités apoptotiques de MET nécessitent son clivage par les caspases. On peut alors émettre l'hypothèse qu'en absence d'HGF, MET maintient la survie des hépatocytes en prévenant l'activation du récepteur Fas par agrégation. Or si ces cellules subissent un quelconque stress, MET est clivé par les caspases, générant ainsi le fragment p40MET-apoptotique, et libère le récepteur Fas ; deux étapes en faveur de l'apoptose (Figure27).

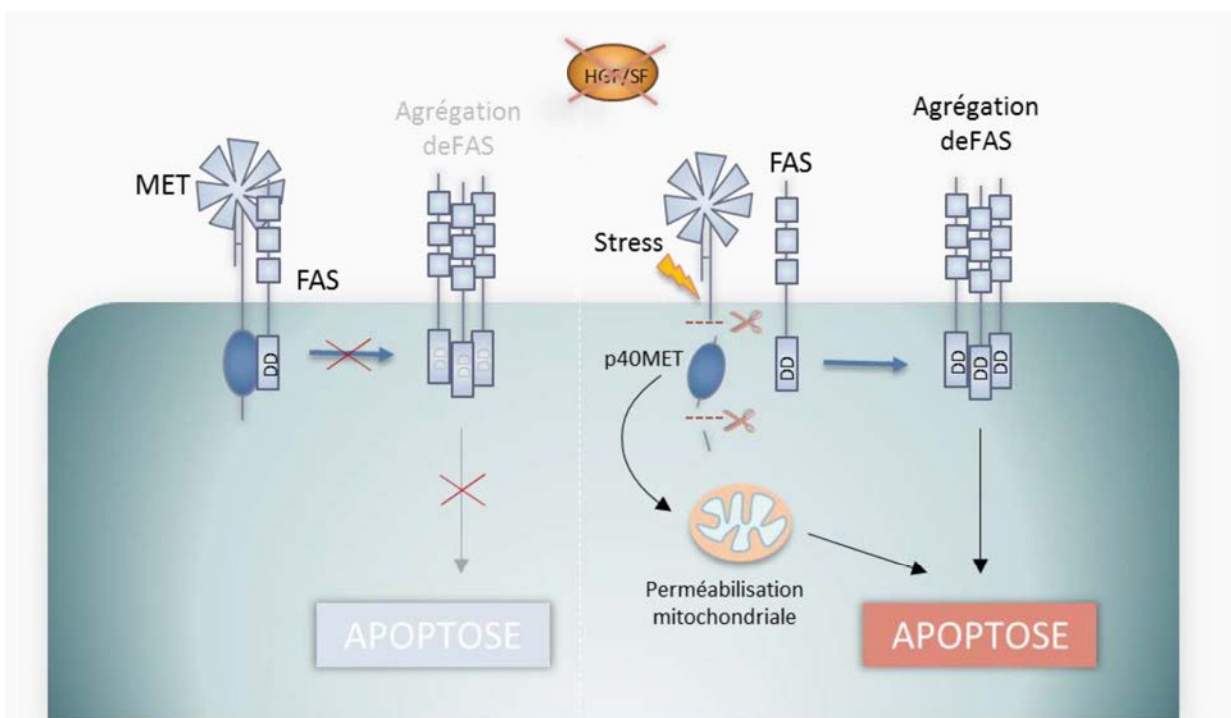


Figure 27 : Proposition du rôle du complexe MET/Fas dans la régulation de la balance survie/apoptose.

En absence de leurs ligands respectifs, MET peut séquestrer le récepteur Fas prévenant ainsi son activation par agrégation et protège les cellules de l'apoptose. En conditions de stress, MET est clivé par les caspases ce qui va, selon notre hypothèse libérer le récepteur Fas. L'apoptose va alors être induite par l'agrégation de Fas et amplifiée par la présence du fragment p40MET.

Afin de vérifier cette hypothèse il faudrait analyser l'interaction, par co-immunoprécipitation par exemple, entre un récepteur MET clivable ou non clivable en juxtamembranaire (muté sur le site ESVD) et le récepteur Fas dans des conditions de stress.

4.6 Implication de MET dans les pathologies où la balance survie/apoptose est déséquilibrée

Le maintien de l'homéostasie cellulaire est assuré par un équilibre entre la survie et la mort cellulaire. De ce fait, un grand nombre de pathologies sont la conséquence d'une altération de cet équilibre. Parmi les pathologies pour lesquelles l'apoptose est trop importante on retrouve les maladies neurodégénératives, les maladies auto-immunes et des pathologies où il y a un stress extérieur important comme dans les cas de stéatoses hépatiques et d'ischémies.

Il a été montré que MET jouait un rôle crucial dans la survie et la régénération du foie (Borowiak et al., 2004; Huh et al., 2004; Schmidt et al., 1995). Une étude récente a mis en évidence, dans un modèle murin soumis à une alimentation carencée en méthionine et choline, que la délétion de MET dans les hépatocytes provoque le développement d'une stéatose hépatique sévère, aussi appelée NASH (*non-alcoholic steatohepatitis*), chez ces souris par rapport à des souris WT (Kroy et al., 2014). La NASH se caractérise par une forte inflammation du foie associée à une augmentation de l'apoptose des hépatocytes pouvant déclencher à terme une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire. Il serait alors intéressant de savoir si un traitement ectopique d'HGF pourrait favoriser la survie cellulaire dans cette pathologie. Une étude récente réalisée sur un modèle murin nourri avec un régime riche en graisses montre que l'administration exogène d'HGF réduit l'inflammation observée au niveau du foie (Li et al., 2018), suggérant qu'un traitement par l'HGF pourrait être pertinent dans le traitement de la NASH.

Plusieurs études se sont penchées sur le potentiel effet protecteur de l'HGF dans des cas d'ischémie. Tout d'abord, une équipe a montré que l'administration d'HGF réduit le volume de l'infarctus observé chez le rat à la suite d'une ischémie cérébrale et ce, de façon dose-dépendante (Tsuzuki et al., 2001). Cet effet protecteur de l'HGF est associé à une baisse de l'apoptose des cellules neuronales. En plus d'inhiber l'apoptose, l'ajout d'HGF favorise la prolifération cellulaire et l'angiogenèse après une ischémie cérébrale ou cardiaque induite chez le rat (Jayasankar et al., 2005; Shang et al., 2011). Cependant, l'effet de l'HGF décrit ici ne tient compte que de l'activation des voies de survie et n'évalue pas les conséquences de la perte de production éventuelle de p40MET en présence d'HGF.

Il serait donc intéressant d'évaluer l'importance de l'activité pro-apoptotique de p40MET dans ces situations pathologiques. Dans de telles conditions, le niveau d'HGF/SF présent dans le microenvironnement est probablement un élément déterminant pour équilibrer l'activité pro-survie et pro-apoptose de MET. Les souris D1374N que nous possédons au laboratoire permettraient d'évaluer l'implication de p40MET dans ces modèles d'ischémie. En effet, lors d'une ischémie on peut facilement concevoir que l'apoptose induite soit amplifiée par les capacités pro-apoptotiques de MET car les cellules sont soumises à des conditions de stress. L'avantage de stimuler le récepteur MET avec son ligand dans ces pathologies est qu'en plus d'inhiber ses capacités pro-apoptotiques, qui participent certainement aux taux élevés d'apoptoses observés, on active sa signalisation pro-survie qui pourra potentiellement contrecarrer l'apoptose et protéger les cellules.

L'implication des capacités pro-apoptotiques des récepteurs à dépendance a été évaluée dans d'autres modèles ; lors de traumatismes cérébraux et médullaires. Deux études ont montré une augmentation de la survie des cellules dans des souris déficientes pour le récepteur EPHB3 comparées à des souris WT suite à une lésion cérébrale ou de la moelle épinière (Theus et al., 2014; Tsenkina et al., 2015). Ces résultats démontrent que c'est la perte du récepteur qui protège les cellules de l'apoptose. Ces deux études montrent également que la mort des cellules peut être réduite chez les souris WT suite à l'administration du ligand EphrinB3.

4.7 En faveur du rôle de MET en tant que suppresseur de tumeur conditionnel

Grâce à leur capacité à induire l'apoptose en absence de ligand il a été proposé que les récepteurs à dépendance puissent être de potentiels suppresseurs de tumeurs. Par exemple, le récepteur DCC est décrit comme délété dans plus de 70% des cancers colorectaux (Fearon et al., 1990) suggérant que la perte du récepteur (et donc de ses capacités apoptotiques) est favorable au développement tumoral. D'autre part, deux études ont montré que la perte des fonctions pro-apoptotiques de DCC était favorable au développement de tumeurs dans un modèle animal avec une prédisposition au cancer colorectal démontrant ainsi que DCC fonctionne bel et bien comme un suppresseur de tumeurs (Castets et al., 2012; Mazelin et al., 2004).

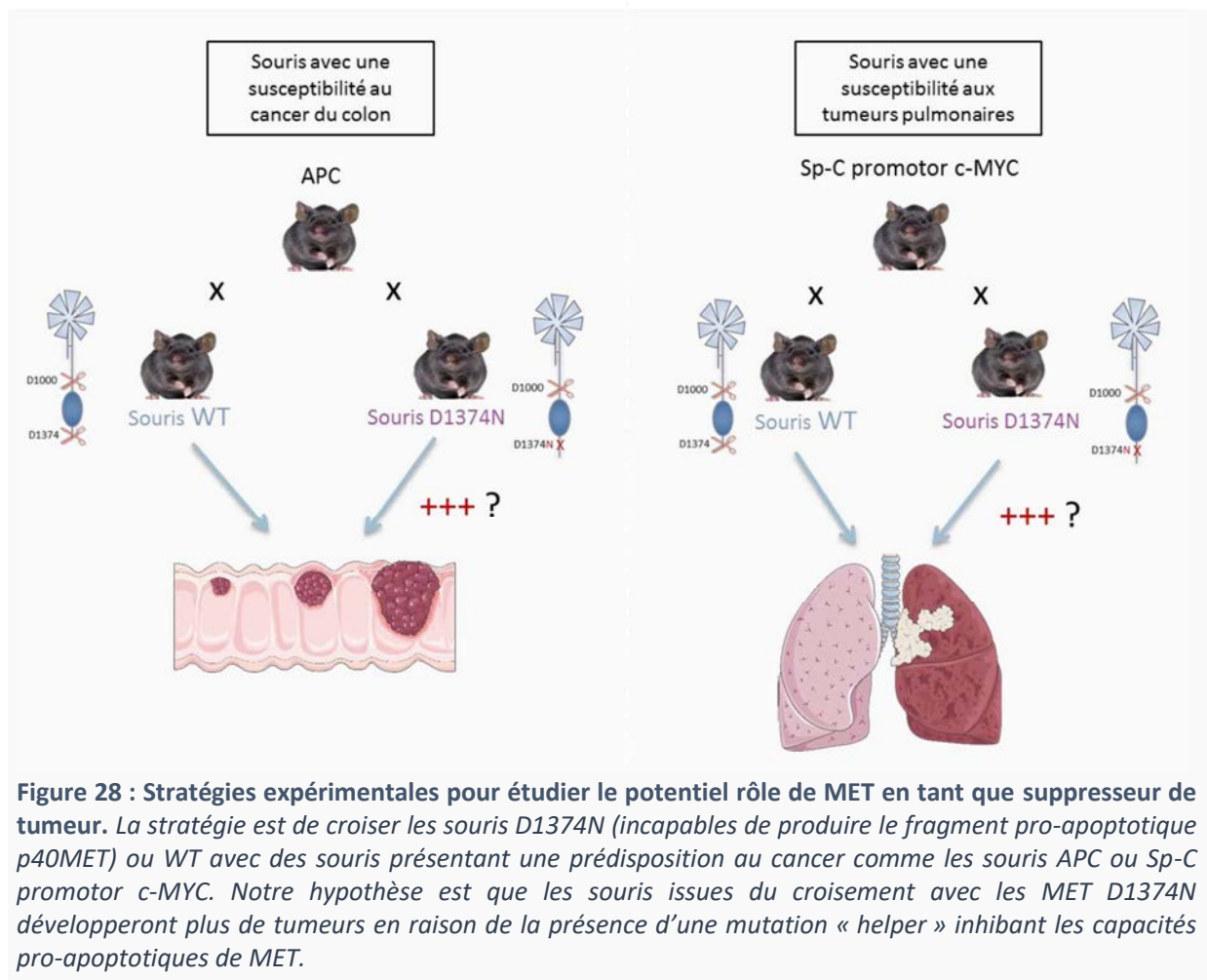
Le cas des récepteurs à dépendance appartenant à la famille des RTKs est un peu plus complexe. En effet, les RTKs sont essentiellement considérés comme des proto-oncogènes en raison de leur capacité à favoriser la survie cellulaire, la prolifération ou encore la migration à la suite de leur activation. Cependant, en absence de ligand, certains de ces RTKs sont capables d'induire l'apoptose et ainsi d'agir comme des suppresseurs de tumeurs. Alors que leur rôle en tant qu'oncogène est avéré,

une sous-expression des récepteurs TrkC et RET (membres de la famille des RTKs et des récepteurs à dépendance) a été observée sur des échantillons humains de cancer colorectal (Luo et al., 2013a, 2013b). Ces résultats suggèrent que la perte de ces récepteurs favorise le développement tumoral. Ces récepteurs sont désormais considérés comme des suppresseurs de tumeurs conditionnels car cette fonction n'est active qu'en absence de leur ligand.

Comme il a été largement décrit dans l'introduction, MET est surtout connu comme étant un oncogène. Pourtant en tant que membre de la famille des récepteurs à dépendance, il pourrait également avoir un rôle suppresseur de tumeur conditionnel. A l'inverse de TrkC ou RET, son expression n'est pas diminuée dans les CCR. Au contraire, diverses études montrent que MET est plutôt surexprimé dans les cancers, y compris dans les CCR, et est associé à un mauvais pronostic (An et al., 2014; De Oliveira et al., 2009; Di Renzo et al., 1995; Takeuchi et al., 2003; Tang et al., 2004; Zeng et al., 2004). Toutefois, on peut se demander si le pouvoir tumorigène de la surexpression de MET est seulement dû à l'activité du domaine kinase ou si l'inhibition de ses capacités apoptotiques va également avoir un impact. Certaines études montrent que la surexpression de MET peut être associée à une suractivation du récepteur notamment dans les cas où la surexpression est due à une amplification génique (Lutterbach et al., 2007; Smolen et al., 2006). Or on sait que l'activation de MET conduit à une inhibition de son clivage par les caspases et donc à l'inhibition de ses capacités à amplifier l'apoptose. Cette question se pose également pour les cas de cancers qui présentent une surexpression d'HGF/SF. Ainsi, nous proposons que si la dérégulation de la signalisation pro-survie du récepteur MET est connue pour expliquer son activité oncogène, la perte des capacités pro-apoptotiques pourrait aussi favoriser la tumorigénèse.

L'utilisation des souris MET D1374N, qui possèdent une version de MET incapable de favoriser l'apoptose, pourrait nous permettre d'avancer sur cette hypothèse. Comme nous l'avons déjà évoqué ces souris sont viables, fertiles et elles ne présentent pas d'anomalies de développement visibles. Ces résultats suggèrent que la mutation n'altère pas la signalisation ligand-dépendante de MET. Des résultats équivalents ont été obtenus dans des souris porteuses d'une mutation de DCC (D1290N) qui inhibe les capacités apoptotiques du récepteur (Castets et al., 2012). D'autre part, comme pour 85,2% des souris DCC D1290N (n=28), aucune tumeur spontanée n'a été observée chez les souris MET D1374N (n=24). Ces résultats suggèrent qu'en absence de stress, l'absence des capacités pro-apoptotiques de MET ne semble pas jouer un rôle essentiel ou alors qu'elles sont compensées par d'autres mécanismes. Dans le cas du récepteur DCC, c'est le croisement des souris DCC D1290N avec des souris APC, présentant une prédisposition au cancer du côlon, qui a permis de révéler son rôle de suppresseur de tumeurs conditionnel. En effet, une augmentation significative du nombre d'adénocarcinomes a été observée chez les souris APC/DCC D1290N comparée aux souris APC/DCC

WT (Castets et al., 2012). Ces résultats suggèrent que la mutation causant la perte des capacités pro-apoptotiques de DCC ne soit pas une mutation driver, mais plutôt une mutation « helper », dans le sens où la perte d'un frein favorise la tumorigénèse. Ainsi, nous pouvons envisager de réaliser le même type d'expérience en croisant les souris WT et MET D1374N avec des souris APC et/ou des souris présentant une prédisposition au cancer du poumon (Sp-C promotor c-MYC) (Figure 28). Notre hypothèse est que les souris issues du croisement avec les MET D1374N développeront plus de tumeurs en raison de la présence d'une mutation « helper » inhibant les capacités pro-apoptotiques de MET.



En accord avec ce concept, la base de données COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) répertorie aujourd'hui dix mutations affectant les sites caspases MET dans divers cancers. Quatre d'entre-elles touchent le motif ESVD du site de clivage juxtamembranaire et sont retrouvées dans des cas de cancer de l'estomac, de l'intestin, du pancréas et du poumon. Les six autres touchent le motif DNADDEVD du site de clivage en C-terminal et ont été identifiées dans des cas de cancers de l'œsophage, de l'utérus, de la thyroïde, de la vessie, des voies aérodigestives supérieure et de l'ovaire.

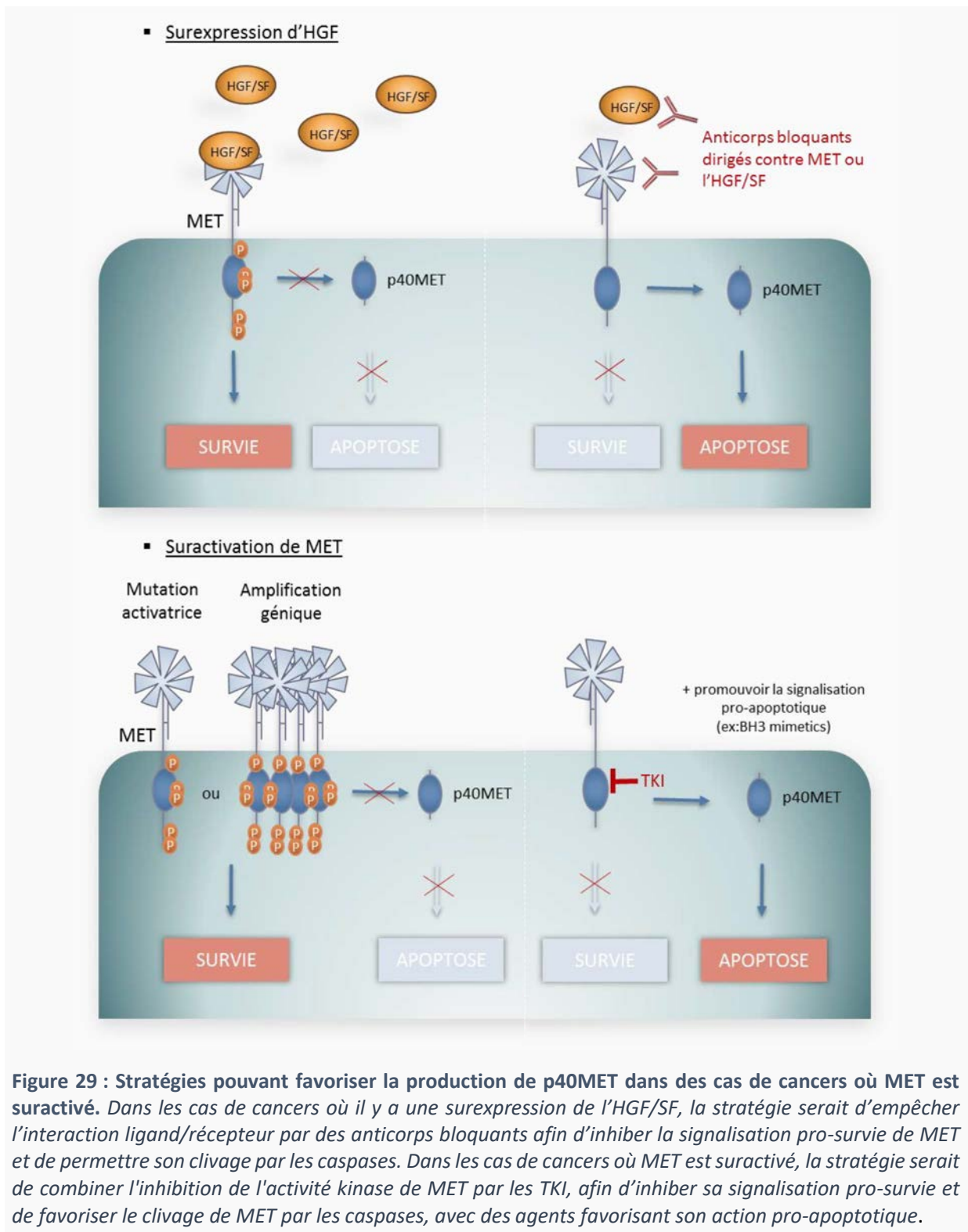
On peut également évoquer les mutations touchant le site d'épissage de l'exon 14 de MET retrouvées dans 3% des tumeurs pulmonaires (Duplaquet et al., 2018). Comme expliqué dans l'introduction, la perte de l'exon 14 entraîne la perte du domaine juxta-membrane MET qui contient le site caspase responsable de la libération de p40MET. Globalement, l'existence de diverses mutations touchant le site de clivage de MET, même si elles ne sont répertoriées que dans un très faible nombre de patients, soutient l'idée que la fonction pro-apoptotique de MET pourrait être un frein à la tumorigénèse.

4.8 p40MET et thérapies dans les cancers

Dans l'hypothèse où les capacités pro-apoptotiques du récepteur MET représentent un frein à la tumorigénèse, favoriser son clivage dans les cellules cancéreuses pourrait être une stratégie intéressante pour ralentir ou même stopper la progression tumorale.

La première stratégie, déjà utilisée pour le récepteur DCC, est d'inhiber l'interaction ligand/récepteur. Plusieurs études précliniques montrent que, dans le cas des récepteurs à dépendance ayant pour ligand la Netrin-1, l'inhibition de l'interaction ligand-récepteur par des anticorps antagonistes, utilisés seuls ou en association avec de la chimiothérapie, réduit la croissance tumorale et la formation de métastases (Delloye-Bourgeois et al., 2009; Fitamant et al., 2008; Paradisi et al., 2013). Ces résultats appuient le fait que cette stratégie pourrait être une approche thérapeutique prometteuse dans le cas de MET.

De la même façon, des anticorps antagonistes contre l'HGF et/ou MET, capables d'inhiber leur interaction, ont été développés. Dans des cas de cancers présentant une surexpression d'HGF, tel que les glioblastomes, l'inhibition de l'activation du récepteur pourrait avoir deux effets complémentaires (Figure 29). Le premier est que la signalisation pro-survie de MET serait bloquée et le deuxième est que l'absence de phosphorylation favoriserait le clivage de MET et le déclenchement de sa signalisation pro-apoptotique. Ainsi, en plus d'empêcher la progression tumorale, MET pourrait promouvoir la mort des cellules cancéreuses.



Dans les cas où la suractivation de MET ne passe pas par l'action de son ligand (amplification génique, mutation activatrice, etc.), tels que dans les cancers pulmonaires et gastriques, la stratégie serait de combiner l'inhibition de l'activité kinase de MET par les TKI, afin d'inhiber sa signalisation pro-survie, avec des agents favorisant son action pro-apoptotique (Figure 29).

Des résultats préliminaires obtenus dans le laboratoire ont montré, sur des lignées cancéreuses humaines présentant une amplification de MET associée à sa suractivation (EBC-1, lignée de carcinomes épidermoïdes pulmonaires humains et GTL-16, lignée de carcinomes gastriques humains), que le fragment p40MET n'était pas ou très peu produit dans les conditions classiques de culture (Figure 30, ou résultats non montrés). L'inactivation dans ces cellules de l'activité kinase de MET par le PHA permet la production de p40MET. De plus, la production de p40MET dans les EBC-1 augmente lorsque le PHA est associé à un BH3 mimétique inhibiteur de BCL-XL, le WEHI-539 (Figure 30A). L'augmentation de l'activation des caspases dans les cellules traitées avec le PHA et le WEHI-539 suggèrent que les inhibiteurs MET et BCL-XL agissent en synergie pour induire la mort des cellules cancéreuses EBC-1 dépendantes de MET. Ces résultats sont cohérents avec d'autres résultats obtenus dans le laboratoire montrant que BCL-XL inhibait l'action pro-apoptotique de p40MET (Lefebvre et al., 2013). D'autres résultats montrent que sans inhibition de l'activité kinase, le traitement de ces cellules avec des agents anticancéreux (ex : 5FU, etoposide etc.) permet le clivage de MET (Figure 30B). Ces résultats suggèrent qu'il y aurait, dans ces cellules surexprimant MET, un pool de récepteurs clivables et donc non activés. L'étape suivante sera de déterminer si la production du fragment p40MET est associée et/ou nécessaire à la mort des cellules cancéreuses.

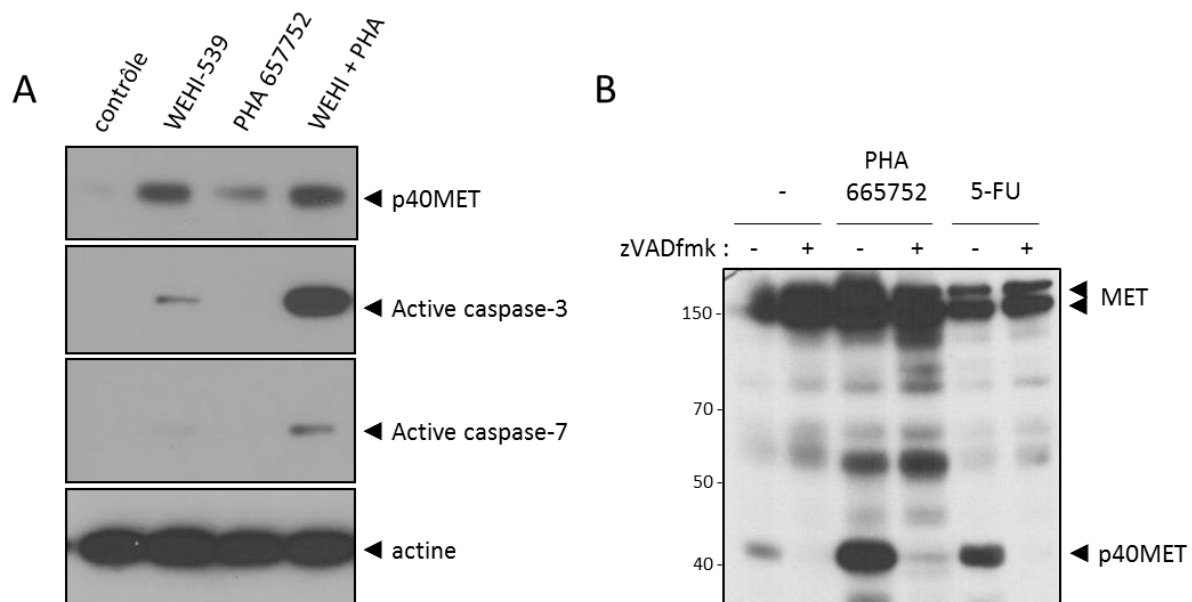


Figure 30 : Production du fragment p40MET sur une lignée cellulaire cancéreuse avec amplification de MET. (A) Les cellules cancéreuses EBC-1 ont été traitées ou non avec 0.1 μ M WEHI-539 et/ou 0.1 μ M PHA. (B) Les cellules EBC-1 ont été incubées 1 h avec 10 μ M de l'inhibiteur de caspases z-VADfmk ou non puis traitées avec 0.1 μ M PHA665752 ou 50 μ M de 5-FU. (A, B) Après 6h de traitement les cellules ont été lysées. Après centrifugation des lysats cellulaires, le surnageant contenant la fraction protéique a été récupéré, dosé et déposé sur un gel SDS-PAGE.

II. Mutation des RTK dans les cancers colorectaux à métastases hépatiques

1. Contexte de l'étude

Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer le plus fréquent dans le monde, avec environ 1,1 million de nouveaux cas répertoriés en 2018 d'après les estimations GLOBOCAN (Bray et al., 2018). On y retrouve des mutations « drivers » fréquentes comme les mutations activatrices touchant KRAS et PI3K ou des mutations inactivant les suppresseurs de tumeurs comme p53 (Graham et al., 2016). Cependant, ces mutations ne peuvent pas à ce jour être traitées par des thérapies ciblées (Akkad et al., 2015). Aujourd'hui, peu de mutations de RTKs ont été répertoriées dans le cancer du côlon. Pourtant il a été démontré qu'ils peuvent y jouer un rôle déterminant comme c'est le cas notamment pour le récepteur HER2/ERBB2, avec des mutations de la kinase, et TrkA après un réarrangement chromosomique (Ardini et al., 2014; Kavuri et al., 2015). L'objectif de ce projet était de rechercher des mutations de RTKs dans les cancers colorectaux à métastases hépatiques et d'analyser leurs conséquences sur l'activité kinase du récepteur. En effet, le défi actuel est d'interpréter la pertinence biologique et clinique de ces mutations dans le but d'attribuer aux patients des thérapies ciblées efficaces. Afin d'augmenter les probabilités de découvrir de nouvelles mutations activatrices de la kinase, qui pourront être ciblées par des TKI dans un cadre thérapeutique, les tests fonctionnels ont été réalisés sur les mutations touchant le domaine kinase des récepteurs.

2. Résumé de l'étude

Avant mon arrivée en thèse l'équipe a pu réunir, en collaboration avec les hôpitaux de Caen, Rouen et Lille, des échantillons de tissus sains, de tumeurs colorectales et de métastases hépatiques provenant de 30 patients. La plateforme de génomique de Lille a ensuite réalisé le séquençage haut débit de la totalité des exons des 58 RTKs caractérisés ainsi que toutes les analyses nécessaires pour la sous-sélection et la validation des variants. Ces dernières étapes consistent notamment à exclure les variants retrouvés dans les tissus sains, qui ne sont donc pas des mutations somatiques, et les variants synonymes. Les résultats nous ont permis d'identifier 38 mutations somatiques distinctes touchant 24 RTKs. Environ la moitié des mutations étaient présentes à la fois dans la tumeur et la métastase et seule la moitié d'entre elles avaient été décrites auparavant. Mon travail a été d'analyser, à partir de modèles cellulaires, la conséquence de ces mutations sur l'activité kinase. Afin d'effectuer une analyse fonctionnelle, les mutations présentes dans le domaine kinase et retrouvées à la fois dans la tumeur et la métastase ont été sélectionnées et sont au nombre de 10. Tout d'abord, j'ai confirmé leur présence par séquençage Sanger sur l'ADN génomique des échantillons de patient. Puis, j'ai

reconstitué 7 d'entre elles par mutagenèse dirigée dans des vecteurs d'expression. Parmi les 7 variants sélectionnés touchant 6 RTKs différents (EPHA4-Met726Ile, EPHB2-Val621Ile, FGFR4-Ala585Thr, VEGFR3-Leu1014Phe, KIT-Pro875Leu, NTRK2-Leu584Val et NTRK2-Lys618Thr), aucun d'entre eux ne montre une augmentation significative de leur activité tyrosine kinase évaluée par la phosphorylation des résidus tyrosine. De manière cohérente, aucun d'entre eux n'a induit la transformation des fibroblastes NIH3T3. En revanche, deux variants (FGFR4-Ala585Thr et FLT4-Leu1014Phe) induisent une inhibition importante de leur activité kinase.

En conclusion, nous avons retrouvé beaucoup de mutations de RTKs chez des patients atteints de cancers colorectaux. La moitié de ces mutations sont originales et, à notre connaissance, leurs conséquences biologiques étaient inconnues. Toutefois, l'analyse fonctionnelle de RTKs mutés au niveau du domaine kinase a révélé une absence d'activation, voire pour certains variants une inhibition, de leur activité kinase. Ces résultats démontrent que ces variants de RTKs ne sont pas des cibles appropriées pour l'utilisation de TKI à des fins thérapeutiques.

Ce travail a permis la rédaction d'un papier original en révision pour publication au journal *Molecular Cancer Therapeutics*.

Publication n°3 : Functional analysis of somatic mutations affecting receptor tyrosine kinase family in metastatic colorectal cancer

Leslie Duplaquet, Martin Figeac, Frédéric Leprêtre, Charline Frandemiche, Céline Villenet, Shéhérazade Sebda, Nasrin Sarafan-Vasseur, Mélanie Bénozène, Audrey Vincent, Gautier Goormachtigh, Laurence Wicquart, Nathalie Rousseau, Ludivine Beaussire, Stéphanie Truant, Pierre Michel, Jean-Christophe Sabourin, Françoise Galateau-Sallé, Marie-Christine Copin, Gérard Zalcmán, Yvan De Launoit, Véronique Fafeur and David Tulasne
Révision MCT

Functional analysis of somatic mutations affecting receptor tyrosine kinase family in metastatic colorectal cancer

Leslie Duplaquet¹, Martin Figeac², Frédéric Leprêtre², Charline Frandemiche^{3,4}, Céline Villenet², Shéhérazade Sebda², Nasrin Sarafan-Vasseur⁵, Mélanie Bénozène¹, Audrey Vinchent¹, Gautier Goormachtigh¹, Laurence Wicquart⁶, Nathalie Rousseau³, Ludivine Beaussire⁵, Stéphanie Truant⁷, Pierre Michel⁸, Jean-Christophe Sabourin⁹, Françoise Galateau-Sallé¹⁰, Marie-Christine Copin^{1,6}, Gérard Zalcman¹¹, Yvan De Launoit¹, Véronique Fafeur¹ and David Tulasne¹

¹ Univ. Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161 - M3T – Mechanisms of Tumorigenesis and Target Therapies, F-59000 Lille, France.

² Univ. Lille, Plateau de génomique fonctionnelle et structurale, CHU Lille, F-59000 Lille, France

³ TCBN - Tumorothèque Caen Basse-Normandie, F-14000 Caen, France.

⁴ Réseau Régional de Cancérologie – OncoBasseNormandie – F14000 Caen – France.

⁵ Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245, IRON group, Rouen University Hospital, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, F-76000 Rouen, France.

⁶ Tumorothèque du C2RC de Lille, F-59037 Lille, France.

⁷ Department of Digestive Surgery and Transplantation, CHU Lille, Univ Lille, 2 Avenue Oscar Lambret, 59037, Lille Cedex, France.

⁸ Department of hepato-gastroenterology, Rouen University Hospital, Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1245, IRON group, F-76000 Rouen, France.

⁹ Department of Pathology, Normandy University, INSERM 1245, Rouen University Hospital, F 76 000 Rouen, France.

¹⁰ Department of Pathology, MESOPATH-MESOBANK, Centre León Bérard, Lyon, France.

¹¹ Thoracic Oncology Department, CIC1425/CLIP2 Paris-Nord, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France.

Running title: Somatic RTK mutations in metastatic colorectal cancer

Corresponding author:

david.tulasne@ibl.cnrs.fr

David Tulasne, CNRS UMR 8161, ¹Univ. Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161 - M3T – Mechanisms of Tumorigenesis and Target Therapies, F-59000 Lille, France Phone : 0033 3 20 87 12 57 ; Fax : 0033 3 20 87 11 11

e-mail : david.tulasne@ibl.cnrs.fr

Keywords: Receptor tyrosine kinase, Next generation sequencing, Colorectal cancer, Hepatic metastasis, Somatic mutations, Functional analysis, Kinase activity

The authors declare no potential conflicts of interest

Abstract

Besides the detection of somatic receptor tyrosine kinases (RTKs) mutations in tumor samples, the current challenge is to interpret their biological relevance in order to give patients effective targeted treatment. By high-throughput sequencing of the 58 RTK exons of healthy tissues, colorectal tumors, and hepatic metastases from 30 patients, 38 different somatic mutations in RTKs were identified. The RTK-kinase-domain mutations present in both tumors and metastases were reconstituted in order to perform an unbiased functional study. Among eight variants found in seven RTKs (EPHA4-Met726Ile, EPHB2-Val621Ile, ERBB4-Thr731Met, FGFR4-Ala585Thr, FLT4-Leu1014Phe, KIT-Pro875Leu, NTRK2-Leu584Val and NTRK2-Lys618Thr), none displayed significantly increased tyrosine kinase activity. Consistently, none of them induced transformation of NIH3T3 fibroblasts. On the contrary, two RTK variants (FGFR4-Ala585Thr and FLT4-Leu1014Phe) caused drastic inhibition of their kinase activity. These findings indicate that these RTK variants are not suitable targets and highlight the importance of functional studies to validate RTK mutations as potential therapeutic target.

Introduction

Receptor tyrosine kinases constitute a large 58-member family in mammals. They all comprise a variable extracellular domain, involved in ligand recognition, and a conserved intracellular tyrosine kinase domain. RTKs regulate a broad spectrum of biological responses, including differentiation, proliferation, motility, and survival. They are also all involved, through ligand/receptor interactions, in the dialogue between tissues of pluricellular organisms. Binding of the ligand to the extracellular domain of an RTK favors its dimerization and modifies its conformation, causing activation of its intracellular tyrosine kinase domain. Subsequent tyrosine phosphorylation in the intracellular domain of the RTK allows recruitment of signaling proteins responsible for signal propagation (1).

RTKs are often found deregulated in cancer, as a result of various molecular alterations leading to their activation. These alterations include mutations, translocations, and gene amplifications. Single nucleotide variants (SNVs) with missense mutations are frequently found in cancer, and are directly responsible of RTK activation. Most RTK-activating mutations have been found in the kinase domain. Examples include the EGFR L858R missense mutation in non-small cell lung cancers (NSCLC) (2), KIT D816V in mastocytosis (3), FLT3 D835N in acute myeloid leukemia (AML) (4), and ALK F1174L in neuroblastoma (5). RTKs have also been found mutated in regions other than the tyrosine kinase domain, including the extracellular ligand-binding domain, but the functional consequences of these mutations are often uncharacterized.

RTK mutation rates in cancer vary according to the cancer type and the RTK. For instance, the D816V variant of KIT was found in 90% of systemic mastocytosis cases (6). Most of the time, however, RTK mutations represent less than 10% of the molecular alterations found in a given cancer type. For instance, EGFR mutations account for 10-12% of the molecular alterations found in NSCLC (7) and FLT3 mutations represent about 7% of those found in AML (4). In addition, many different activating mutations are liable to affect a given RTK. In papillary renal cell carcinomas, for instance, seven different MET-activating mutations have been characterized (8).

Recent advances in high-throughput sequencing of genomic DNA and mRNA have revealed the considerable diversity of RTK mutations in cancer, as recorded in the COSMIC database (<http://www.sanger.ac.uk/cosmic>). For instance, genomic sequencing data extracted from several studies and compiled in the COSMIC database reveal more than a thousand ERBB4 mutations among 39,846 tumor samples. Only some of these have been functionally studied, but this has notably revealed the existence of two ERBB4-activating mutations in NSCLC of which clinical impact is still unknown (9). In most other RTKs, likewise, many mutations have been described, but the functional consequences of most of them, including missense mutations in the kinase domain, have not yet been investigated. Thus, because activating mutations in RTKs are diverse and often present at low rates in cancer, it is hard to know whether an RTK alteration revealed by high-throughput sequencing can lead to receptor activation.

Despite these difficulties, characterizing RTK alterations is clinically crucial, since many recent targeted therapies, under development or already used clinically, are directed against members of this receptor family. This applies notably to melanoma, leukemia, and lung, breast, and colorectal cancers (10-12). The inhibitors used in such therapies include monoclonal antibodies that prevent

ligand/receptor binding or receptor dimerization and tyrosine kinase inhibitors (TKIs) inhibiting tyrosine kinase activity. Importantly, the efficacy of these targeted therapies depends on the presence, in the targeted RTK, of molecular alterations leading (i) to its unambiguous activation (ii) to a dependency for cell survival on this mutation, the so-called "oncogene addiction", both characteristics defining a driver mutation (for a review see (13)). For example, TKIs targeting EGFR can be used to treat NSCLC patients whose tumors harbor EGFR-activating mutations (14).

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide, with about 1.4 million cases in 2012 (15). The early stage is highly curable, mainly by surgery, radiotherapy, and adjuvant chemotherapy. About half of all CRC patients, however, display metastases either at diagnosis (synchronic metastases) or after resection of the primary tumor. These metastases are mainly located in the liver (16). Importantly, the five-year survival of metastatic CRC patients is only about 10% (French National Cancer Institute, 2010 Report). Although liver metastases can be resected surgically, the treatment of metastatic disease is based mainly on chemotherapy and, more rarely, on targeted therapies (17).

Many well-known genomic alterations have been identified in CRC, including KRAS- and PI3K-activating mutations found, respectively, in about 40% and 15% of CRCs. Tumor-suppressor-inactivating mutations are also often found in CRC, such as mutations in APC or p53 (18). All these alterations are frequently found in both tumor and metastatic samples, which confirms their importance in tumor progression (19). None of these alterations, however, is targetable by current novel targeted therapies (17).

Interestingly, some RTK alterations have recently been characterized in advanced CRC. According to The Cancer Genome Atlas consortium, for instance, HER2 gene amplification or HER2 somatic mutations are present in 7% of CRC patients (20). Mutations in the HER kinase domain, already identified as activating mutations in breast cancer, have been shown to induce HER2 activation and transformation of colorectal cell lines (21). Translocation of the TRKA gene, leading to constitutive activation of its kinase domain and likewise resulting in cell transformation, has also been found in CRC, albeit in less than 2% of cases (22). Lastly, treatment with monoclonal antibodies directed against EGFR has proven effective, provided that KRAS was not mutated (23). The efficacy of this treatment could be related to ligand-dependent activation of EGFR via an autocrine activation loop (24). Altogether, these recent findings reveal that RTK alterations, including somatic mutations, occur at a relatively low rate in CRC. They might open the way for treatments specifically targeting RTK variants.

The above findings have led us to wonder if other targetable RTK mutations might be present in CRC. To answer this question, we performed deep high-throughput sequencing of the 58 RTK and control genes frequently mutated in CRC. We chose to sequence healthy tissues, tumors, and hepatic metastases from each of thirty patients, firstly to eliminate constitutional mutations present in healthy tissues and secondly to select mutations present in both tumors and metastases, like the currently well-known driver mutants. Identified RTK mutations located in the kinase domain and present in both tumors and metastases were further analyzed functionally, in a systematic fashion, to evaluate their ability or inability to activate the kinase.

Materials and Methods

Sample preparation and DNA extraction

The samples were used in accordance to the legislation of two French biobanks, “Tumorotheque Caen Basse-Normandie (TCBN)” and “Tumorotheque C2RC de Lille” which are *certified* in conformity with the norm AFNOR *NF-S 96-900* (Quality of *Biological Resources Centers*).

All tissue samples were collected from 30 patients who underwent surgical resection for metastatic colorectal cancer between 2004 and 2012. For each patient, colorectal tumor tissue, colorectal non tumoral tissue and hepatic metastasis tissue were selected. At the time of resection, the specimens were transported in identified containers at 4°C or room temperature to the Department of pathology. The transport time was generally <30 min. The specimens were examined by a pathologist and are oriented, measured and described. Tumor bank’s Tissues were collected in a range that not affects diagnosis. After removal, tumor tissues of 0.5x0.5x0.5cm³ were stored in labeled cryovials and snap frozen in liquid nitrogen, and then transferred and stored at -80°C until DNA extraction. Clinical Data for these samples are shown in Table 1.

For the DNA extraction, a commercial DNA extraction kits were used as manufacturer’s instructions, Qiagen, QIAamp DNA Mini QIAcube Kit[®]. 60 to 80 twenty-micron-thick sections were cut with a cryostat and were homogenized in the supplied lysis buffer with Proteinase K. All samples were incubated at 56°C for 1 night under agitation (1100 rpm). The DNA was bound to a spin column filter, then washed with 96–100% ethanol, followed by two wash buffers (supplied). The bound DNA was eluted from the spin column filter with the supplied elution buffer. Absorbance measurements were made on a spectrophotometer (Nanovue). Finally, the DNA Samples were sent to the Functional and Structural Genomic Platform, Lille, France.

Targeted next generation sequencing

A haloplex panel was designed to cover the 58 RTK genes plus the KRAS and PI3KCA oncogenes and the TP53 tumor suppressor gene. The panel was designed for Illumina sequencers on Agilent’s SureDesign website (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/index.htm>). It covers whole exonic coding sequences with a 10-base offset in intronic sequences of our targeted genes and consists of 17,116 amplicons covering 230,179 bases of the human genome (hg19, GRCh37 assembly). The panel was manufactured by Agilent and is available on request.

Library preparation and sequencing

Libraries were prepared with the HaloPlex target enrichment kit (Agilent, Santa Clara, USA) according to the manufacturer’s instructions except that we used 125 ng starting DNA instead of 250 ng. Briefly, samples were digested with eight different restriction enzymes and enriched in the target regions by using highly specific biotinylated complementary probes. Hybridized probes were captured with magnetic beads and target fragments were ligated to create circular DNA molecules. After the libraries were amplified by PCR, they were pooled in equimolar amounts in two pools. Sequencing was performed on two lanes of a Hi-Seq Illumina sequencer (Illumina, Inc.)

Cytokines, drugs, and cell cultures.

SCF and BDNF were purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA) Imatinib and entrectinib (25) were purchased from Selleckchem (Houston, TX, USA). HEK293 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Invitrogen) and antibiotics. NIH3T3 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% bovine calf serum (Invitrogen) and antibiotics. HCT-116 cells were cultured in McCoy's 5A medium (Invitrogen) supplemented with 10% FCS and antibiotics.

Western blots

Western blotting was performed as previously described (26). Samples were resolved by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis or precast 4 to 12% gradient gel (Thermo Fisher, MA, USA). For quantification of protein expression, luminescence was captured with a digital imaging using a cooled charge coupled device (CCD) camera (LAS 3000, Fuji, Tokyo, Japan), and quantification was performed using Multigauge V3.0 software. The background adjusted volume was normalized to empty well.

Transfection and NIH3T3 transformation

NIH3T3 cells (300,000 cells in a 6-well plate) were transfected with FuGENE HD (Promega, WI, USA) (2 μ g DNA/8 μ l FuGENE in 100 μ l Opti-MEM medium, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). The next day, the cells were transferred to a 100-mm plate and cultured two days later in 5% calf serum medium. 15 days later, the cells were fixed in fast green/methanol and stained with Carazzi/Eosin.

Sanger sequencing

Primers for NGS variant validation were designed with the Oligo7 software. Primer sequences are described in Supplementary Figure S4. Patient sample DNA was amplified by PCR, sequenced by Sanger sequencing, and analyzed with Chromas software.

Mutagenesis

Substitution mutagenesis was performed with the QuikChange® II XL kit (Stratagene, CA, USA) according to an adapted protocol (27). Plasmids and primers are described in Supplementary Figure S5. The two complementary primers used for mutagenesis were designed to contain appropriate base changes. Briefly, a two-step PCR was performed to insert mutations into plasmids. A first, three-cycle PCR was completed with a single primer (forward or reverse) to promote elongated primer hybridization. The PCR products were then mixed and a second, 18-cycle conventional PCR was carried out. The generated PCR products were treated with Dpn1 enzyme to digest the parental plasmids. Total DNA was purified by phenol-chloroform extraction and then precipitated with isopropanol in order to improve transformation of TAM1 Competent *E. coli*. Successful introduction of mutations was checked by Sanger sequencing.

RTK 3D kinase structure

3D structures of the RTK kinase domains were downloaded from the Protein Data Bank (PDB) (www.rcsb.org) with the following PDB IDs: 4asz for NTRK2, 4qqt for FGFR4, 4u0i for KIT, 2r2p for EphA5, 2y6m for EphA4, 3zfm EphB2, 3bbw for ERBB4 and 3hng for VEGFR1. The mutated amino acids of the kinase domain were modified with Swiss-pdb Viewer 4.1.0 software and final pictures were produced with NGL viewer 0.10.4 software.

Results

Targeted next generation sequencing of genomic DNA from healthy tissues, colorectal tumors, and hepatic metastases

Thirty patients with colorectal cancer and hepatic metastases, with available frozen surgical samples of healthy, tumor, and metastatic tissues, were identified in three hospitals located in the north of France. Twenty-two patients had received chemotherapy before the surgery and eight were naïve of treatment. The clinical data concerning these patients are summarized in Table 1. Centralized anatomopathological analysis confirmed the normal or pathological status of each sample. All the selected patients displayed at least 50% pathological tissue in the tumor and metastasis samples and 100% normal tissue in the healthy tissue sample.

Genomic DNA was extracted from each sample and targeted next generation sequencing was performed in order to sequence all the exons of the 58 RTK genes and of three genes frequently mutated in metastatic colorectal cancers use as internal control for sequencing robustness: the KRAS and PI3KCA oncogenes and the tumor suppressor gene TP53.

Alignment of the raw data with the hg19 genome was performed with Noalign software and produced a total of 20,538,106,880 bases, with a mean depth of 2158 bases per sample. Variant calling performed with FreeBayes software produced 871 individual variants, which were annotated with Annovar software. The list of variants was reduced to 325 variants after filtering out the variants found in normal tissues to exclude non-somatic ones. After exclusion of variants found in databases, this list was limited to 321 variants, and after selection according to their positions with respect to CDS sequences and splicing sites, followed by elimination of synonymous variants, there remained 233 variants. Finally, we filtered this last list according to the variant-calling quality (at least 40 in QUAL) and produced 68 candidate variants for functional analysis (Figure. 1).

In tumors and metastatic tissues, RTKs displayed 38 different, mainly unknown somatic mutations

After the selection process, the 68 remaining variants included 38 different mutations in RTKs and 30 different mutations in KRAS, PI3KCA, or TP53 (Figure 2 and Supplementary Figure S1 for details of all variants). In this pool of variants some, such as KRAS G12V, were found several times, in different patients. In all, the 30 patients displayed 50 mutations in KRAS, PI3KCA, or TP53. All of these had previously been included in somatic mutation databases (Supplementary Figure S1) and 78% (39/50) of them were found in both the tumor and the metastatic tissue of the patient concerned (Figure 2), as previously described for some of these well-known driver mutations (19).

All the KRAS mutations described at time of clinical diagnosis, mainly by SNaPshot, were subsequently confirmed by NGS (10/10). Other patients, not tested at diagnosis, also displayed KRAS mutations in our sequencing process. This brought to 60% (18/30) the proportion of patients with KRAS mutations (Supplementary Figure S2). Confirmation of the KRAS mutations found at diagnosis and the fact that all the KRAS, PI3KCA, and TP53 variants had already been described validated the quality of sequencing and the variant selection process.

In RTK genes, 38 different somatic mutations were identified in 20 patients. Ten patients did not harbor any RTK somatic mutation. Each mutation was found only once among the 20 patients. Half of these variants were not reported in the examined main variant data bases (Supplementary Figure S1). We found 44% of the mutations (17/38) in both the tumor and the metastatic tissue from the patient concerned. The others were about equally distributed between the tumor (9 variants) and the metastatic tissue (12 variants). Among the 58 RTKs, less than half harbored somatic mutations (24 RTK) and some of them, such as EPHA4, EPHA5, ERBB4, FGFR4, NTRK2 or FLT4, harbored several different mutations (Supplementary Figure S3). Interestingly, 50% (19/38) of the variants were located in the tyrosine kinase domain of the RTK (Figure 2 and Supplementary Figure S1).

Sub-selection and validation of variants for further functional analysis

Next, we sub-selected a reasonable number of variants suitable for performing further functional analyses aiming to evaluate their impact on RTK activity. First, we selected mutations present in both the tumor and the metastatic tissue, i. e. 17 variants out of the 38. This choice was made because most of the known driver mutations affecting KRAS, PI3KCA, or TP53 have been found in both types of tumor tissues. Then, among these 17 variants, we selected the somatic mutations affecting the kinase domain of the RTK, i. e. 10 mutations, as most RTK-activating somatic mutations are located in the kinase domain. Representative examples include EGFR mutations in lung cancer (14) and MET mutations in papillary renal cell carcinoma (8).

The 10 mutations affecting the 9 RTK genes are the following: EPHA2-Val800Met, EPHA4-Met726Ile, EPHA5-Arg694Cys, EPHB2-Val621Ile, ERBB4-Thr731Met, FGFR4-Ala585Thr, VEGFR3-Leu1014Phe(FLT4), KIT-Pro875Leu, TRKB-Leu584Val(NTRK2), and TRKB-Lys618Thr (Highlighted in Figure 2). Before functional analysis, Sanger sequencing of these mutations was performed, after amplification by PCR, on genomic DNA from the healthy, tumor, and metastatic tissues (Supplementary Figure S4A). All but one of the variants were absent from the normal tissue but present in both the tumor and metastatic tissue. The exception was EPHB2-Val621Ile, present in the metastatic tissue but not in the tumor sample, but the allelic ratio found by NGS (0.1) was below the detection limit of Sanger sequencing (Supplementary Figure S4B). Thus, Sanger sequencing confirmed the NGS data and validated the choice of the selected variants.

The somatic mutations either inhibit kinase activity or do not modify it

For functional analysis, the somatic mutations were reconstituted by directed mutagenesis in expression vectors for the relevant RTKs (Supplementary Figure S5). For EPHA2 and EPHA5, no expression vector was found in any academic laboratory. We were thus able to reconstitute 8 somatic mutations in 7 different RTKs. All constructs were verified by Sanger sequencing. The receptors were detected with commercially available antibodies specifically recognizing the receptor itself (TRKB/NTRK2, VEGFR3/FLT4, KIT) or a fused C-terminal *tag* (FGFR4-*HA*, ERBB4-*HA*, EPHB2-*MYC*, EPHB4-*FLAG*). The tyrosine-phosphorylated form of each RTK was detected with commercially available antibodies directed against one or more intracellular phosphorylated tyrosine residue(s) specific to that RTK. The antibodies used are listed in Supplementary Figure S6.

HEK-293T cells were transfected with rising concentrations of a vector expressing either a WT or a mutated version of the RTK to be studied, and RTK expression and phosphorylation were evaluated by western blotting. The ERBB4 receptor could not be functionally analyzed because transfection did not lead to a detectable level of receptor. In all other cases, transfection with increasing amounts of vector led to increasing levels of WT or mutated receptor (Fig. 3 and 4). For FGFR4, maximal expression of the receptor gene was observed already at the smallest DNA concentration tested (0.25 μ g), suggesting that expression from this vector is highly efficient in HEK293 cells (Fig. 4A). For VEGFR3 (FLT4) and TRKB (NTRK2), the amount of receptor produced appeared first to rise as the amount of transfecting DNA increased, but then to drop as it increased further, suggesting either a decrease of the transfection efficiency at high DNA concentration or cell toxicity of the receptor produced (Fig. 3I and Fig 4C). In all cases, the levels of the WT and mutated RTK were generally similar along the dose-response curve, demonstrating that the mutations do not affect receptor expression or stability. Reprobing with antibodies directed specifically against tyrosine-phosphorylated forms showed that all the WT RTKs were phosphorylated in cells transiently transfected without ligand stimulation. Ligand-independent phosphorylation upon transient transfection has previously been observed for other RTKs (28), a likely consequence of overexpression. The mutated forms EPHA4-Met726Ile, EPHB2-Val621Ile, KIT-Pro875Leu, TRKB-Leu584Val (*NTRK2* gene) and TRKB-Lys618Thr displayed phosphorylation levels similar to those of their respective WT forms (Fig. 3 A,C,E,G,I). In contrast, the mutated forms FGFR4-Ala585Thr and VEGFR3-Leu1014Phe (*FLT4* gene) displayed no detectable tyrosine phosphorylation whatever the vector concentration used (Fig. 4 A and C). Similar absence of detectable VEGFR3-Leu1014Phe phosphorylation was obtained in human colorectal carcinoma cells HCT-116 (Fig. 4E). Western blot quantifications for two representative situations confirmed abolition of tyrosine phosphorylation of the FGFR4 Ala585Thr variant and absence of effect for TRKB Lys618Thr and Leu584Ile variants (Supplementary Figure S7). Response to ligand stimulation was also investigated for KIT and TRKB receptors. Nor the KIT ligand SCF or the TRKB ligand BDNF increased tyrosine phosphorylation of their respective WT or mutated receptor (Supplementary Figure S8A and B). Nevertheless, it is worth noticing that transient transfection induced their constitutive phosphorylation that can mask ligand stimulation. Furthermore, phosphorylation inhibition by tyrosine kinase inhibitors (TKI), used for patient treatment, was tested for WT and mutated forms of KIT and TRKB. KIT inhibitor imatinib and TRKB inhibitor entrectinib were able to inhibit phosphorylation of WT and mutated KIT and TRKB stimulated or not by their respective ligand, indicating that these variants do not modify either the respond to selective TKI (Supplementary Figure S8A and B). All together our results indicate that tyrosine kinase activity is inhibited in the FGFR4-Ala585Thr and VEGFR3-Leu1014Phe variants, while the other variants tested showed unaltered kinase activity. Thus, none of the tested mutations seems to activate the tyrosine kinase domain.

Each mutation was inserted into the 3D representation of the crystal structure of the relevant kinase domain, when available, in order to visualize its location with respect to the kinase subdomains (Fig. 3B,D,F,H,J and Fig. 4B,D). As the crystal structure of the VEGFR3 kinase domain was unavailable and as the kinase domains of VEGFR1 and VEGFR3 display high homology (see their AA

alignment in Supplementary Figure S9), the VEGFR1 Leu999Phe mutation corresponding to the VEGFR3-Leu1014Phe mutation was inserted into the 3D structure of VEGFR1 (Fig. 4D). The mutations appeared distributed over the various kinase subdomains.

To evaluate the transforming properties of the WT and mutated RTKs, the corresponding expression vectors were used to transfect NIH3T3 fibroblasts, and colony formation was estimated two weeks later. As expected, transfection with the HRAS G12V oncogene efficiently induced NIH3T3 transformation (Fig. 5). Pictures of the NIH3T3 plates are shown in Supplementary Figure S10. Among the WT receptors, only KIT and TRKB induced a statistically significant colony formation increase as compared to the empty vector, and to a lesser extent than HRAS G12V. No mutated receptor was found to increase colony formation significantly. The only variant displaying any effect on NIH3T3 transformation was KIT Pro875Ile. This variant actually had a negative effect, suggesting that the corresponding mutation affects the transforming capacity of the receptor. Since FGFR4 WT and VEGFR3 WT induced no NIH3T3 transformation, it was impossible to evaluate whether the studied inactivating mutations in these receptors might negatively affect their transforming capacity. Thus, evaluation of colony formation did not reveal any transforming properties of the different mutated RTKs.

Discussion

Colorectal cancers harbor many well-known somatic alterations, including mutations in KRAS, PI3K, APC, or p53. Recently, thanks to high-throughput sequencing, RTK alterations have also been characterized, including mutations in the HER2 kinase and translocation of TRKA, found infrequently in CRC but potentially allowing treatment with TKIs targeting them (20-22). In this study, deep high-throughput sequencing revealed 38 mutations in RTKs, only five of which were already referenced in the COSMIC database. This suggests the existence of various RTK mutations in metastatic CRC, particularly since they were found in a relatively small cohort of 30 patients. To detect somatic mutations specifically, we chose to sequence genomic DNA from adjacent healthy tissue from all 30 patients in order to eliminate constitutional mutations from our list. We also sequenced genomic DNA from metastases to obtain information about the persistence of these mutations in metastatic lesions. It is worth noting that about 80% of the KRAS, PI3K, and p53 mutations were found in both the tumor and the metastatic tissue of the patient concerned as expected for driver mutations. The robustness of the sequencing was proved by several independent lines of evidence. Firstly, as all the KRAS, PI3K, and p53 mutations found are described in variant databases, at least for these three genes the sequencing did not yield aberrant variants. Secondly, all the KRAS mutations characterized at diagnosis with SNaPshot were confirmed by targeted NGS. Thirdly, all the RTK mutations selected for further functional analysis were confirmed by Sanger sequencing of genomic DNA from tumors and metastases, while they were absent from healthy tissue.

Among the 58 RTKs, less than half harbored somatic mutations and some of them, such as TRKB, VEGFR3, and EPHA5, harbored several different mutations. None of the 38 variants was found in more than one patient, suggesting that each occurs at a low rate. While 78% of the KRAS, PI3K, and p53 mutations were found in both the tumor tissue and the metastatic tissue from the patient concerned, this was true of only 44% of the mutations affecting RTKs, and the remaining 56% appeared equally distributed between tumors and metastases. Thus, in contrast to the well-known drivers, RTK mutations are not predominantly present in both the tumor and its metastases. As they are not preferentially present in the metastases either, they do not appear associated with the metastatic process.

In recent years, the number of discovered genomic alterations has increased exponentially, thanks notably to high-throughput sequencing of large tumor cohorts as in The Cancer Genome Atlas project (29). So far, however, only a few activating mutations have been clearly identified. In addition to activating mutations that occur fairly frequently in certain cancer types, such as those altering EGFR in lung cancer (14) or FLT3 in AML (4), recent functional studies have highlighted activating mutations that occur at a relatively low rate, such as ones affecting ERBB4 in NSCLC (9). A systematic functional analysis of RTK variants in cancer could thus provide important information regarding their involvement or not in the tumorigenic process. Such a functional analysis is possible thanks to commercially available antibodies specifically recognizing one or more phosphorylated tyrosine residue(s) in each RTK and to the availability of expression vectors for most RTKs. Here we show that among seven RTK variants, two displayed a drastic decrease in tyrosine phosphorylation and the other five showed unmodified phosphorylation. NIH3T3 transformation assays confirmed that none of

these mutated RTKs had an increased transforming capacity. In contrast to our initial hypothesis that RTK variants located in the kinase domain and present in both tumor and metastasis could be activated mutations, our data suggest that the functionally tested variants do not cause increased kinase activity. Since only activating mutations of RTKs have been shown to be involved in tumorigenesis, the present functional data suggest that the mutations studied are not driver mutations. This precludes the use of TKIs targeting the mutated receptors as a therapeutic strategy.

Analysis of the COSMIC database indicates that several other non-synonymous variants affecting these RTKs are described in colorectal cancers (with for instance 69 variant for EPHA4, 66 for KIT or 45 for NTRK2). These variants were found all along the coding sequence. Interestingly, to our knowledge, none of these variants was described as activating mutation and it is likely that none functional studies were carried out to investigate their consequence on receptor activation. In light to our present study, demonstrating that none of the testing RTK variants are activating mutations, we can assume that most of the already described rare variants are also non-activating mutations and are thus unsuitable targets for tyrosine kinase inhibitors. Nevertheless, only extensive functional studies could rule out their adverse impact.

Interestingly, we have found two mutated RTKs (FGFR4-Ala585Thr and FLT4-Leu1014Phe) to display a drastic decrease in tyrosine phosphorylation. One would expect these inactivating mutations to play no role in the transformation process. Yet a BRAF-inactivating mutation previously reported in patients has recently been shown to play a positive role: the kinase-inactive BRAF Asp631Ala mutant (corresponding to human BRAF Asp594Ala) triggers lung adenocarcinoma in transgenic mice. BRAF inactivation through mutation could thus be an initiating event in lung oncogenesis (30). This counterintuitive effect is explained by enhanced heterodimerization and activation of catalytically competent CRAF in a BRAFAsp631Ala/CRAF complex (31). Interestingly, FGFR4 and VEGFR3 both belong to a subgroup of RTKs showing high homology (FGFR1, 2, 3, and 4 and VEGFR1, 2, and 3). Interestingly, the results of a recent FRET analysis suggest that the presence of FGFR-activating mutations might promote heterodimerization of FGFR (32). Similarly, VEGFR1/VEGFR3 heterodimerization has been evidenced by proximity ligation, and this interaction might be involved in regulating angiogenic sprouting (33). In the light of the regulatory effect of the above-mentioned BRAF-inactivating mutation on the BRAF/CRAF complex, it would be interesting to investigate the influence of FGFR4- and VEGFR3-inactivating mutations on the kinase activity of heterodimers formed with another member of the family.

By adding the identified RTK mutations to the 3D representations of their available crystal structures, we have been able to locate them with respect to the kinase subdomains. The FGFR4-inactivating mutation is located near the ATP pocket, which could influence ATP accessibility. The VEGFR3-inactivating mutation lies at the beginning of the second alpha-helix, located C-terminally with respect to the ATP pocket. Interestingly, the mutation in EPHA4 also lies at the beginning of this alpha helix (spatially close to the position of the VEGFR3-inactivating mutation), but we have shown that the EPHA4 mutation does not inactivate the kinase. This highlights the difficulty of predicting the functional consequences of a particular mutation on the sole basis of its location.

To restrict the number of functional analyses, we have focused here on mutations present in the kinase domain and thus likely to be involved in kinase regulation. Yet mutations localized outside the kinase domain can also influence RTK activity. For instance, it has recently been shown that 3% of NSCLCs display mutations leading to skipping of exon 14 of MET. This in-frame exon skipping causes deletion of the juxtamembrane domain at the N-terminus of the MET kinase domain. The juxtamembrane region is a well-known regulatory domain involved in stabilizing and activating the receptor (34). We thus cannot exclude that alterations lying outside the kinase domain might be activating or inhibiting mutations.

The current challenge is no longer to identify somatic mutations, which are increasingly easy to detect thanks to the development of the high-throughput sequencing. The challenge is rather to interpret these alterations biologically and clinically. Here we have revealed multiple original RTK mutations in metastatic colorectal cancers, but none of the tested mutations was found to induce activation of the RTK or to increase its transforming capacity. The fact that the mutated RTKs are not activated suggests that they are probably not involved in tumorigenesis and that treatment with TKIs targeting them would be ineffective. Therefore, in parallel to conducting high-throughput sequencing, it appears important to set up reliable functional assays, ideally usable in molecular diagnosis, to interpret identified variants and classify them as pathogenic or neutral. This functional information could notably influence the choice of a suitable targeted therapy.

Acknowledgments

This work was supported by the CNRS, the Institut Pasteur de Lille, and INSERM, and by grants from the "Cancéropôle Nord-Ouest", the "Ligue Contre le Cancer, Comité Nord" and the "Institut National du Cancer". We would like to thank Dr Liebl, Dr Elenius, Dr Klein, Dr Kaijalainen, Dr Lu, Dr Dubreuil, Dr Alitalo and Dr Ittmann for providing the RTK expression vectors. We would like to thank the « Centre de Traitement des Données du Cancéropôle Nord-Ouest » for clinical data processing.

References

1. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010 Jun 25;141(7):1117-34.
2. Shigematsu H, Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *International journal of cancer* 2006 Jan 15;118(2):257-62.
3. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995 Nov 7;92(23):10560-4.
4. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001 Apr 15;97(8):2434-9.
5. Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L, et al. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 2008 Oct 16;455(7215):967-70.
6. Komi DEA, Rambasek T, Wohrl S. Mastocytosis: from a Molecular Point of View. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2017 Jul 19.
7. Barlesi F, Mazieres J, Merlio JP, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet (London, England)* 2016 Apr 2;387(10026):1415-26.
8. Schmidt L, Duh FM, Chen F, et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nature genetics* 1997;16(1):68-73.
9. Kurppa KJ, Denessiouk K, Johnson MS, Elenius K. Activating ERBB4 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2016 Mar 10;35(10):1283-91.
10. Dimitriou F, Braun RP, Mangana J. Update on adjuvant melanoma therapy. *Current opinion in oncology* 2017 Dec 18.
11. Kayser S, Levis MJ. Advances in targeted therapy for acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology* 2017 Nov 28.
12. Oberndorfer F, Mullauer L. Molecular pathology of lung cancer: current status and perspectives. *Current opinion in oncology* 2017 Dec 14.
13. Duplaquet L, Kherrouche Z, Baldacci S, et al. The multiple paths towards MET receptor addiction in cancer. *Oncogene* 2018 Mar 19.
14. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science (New York, NY)* 2004 Jun 4;304(5676):1497-500.
15. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer* 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
16. Adam R, Hoti E, Folprecht G, Benson AB. Accomplishments in 2008 in the management of curable metastatic colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2009 Sep;3(5 Supplement 2):S15-22.
17. Akkad J, Bochum S, Martens UM. Personalized treatment for colorectal cancer: novel developments and putative therapeutic strategies. *Langenbeck's archives of surgery* 2015 Feb;400(2):129-43.
18. Graham DM, Coyle VM, Kennedy RD, Wilson RH. Molecular Subtypes and Personalized Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *Current colorectal cancer reports* 2016;12:141-50.
19. Huang D, Sun W, Zhou Y, et al. Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. *Cancer metastasis reviews* 2018 Jan 10.
20. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012 Jul 18;487(7407):330-7.
21. Kavuri SM, Jain N, Galimi F, et al. HER2 activating mutations are targets for colorectal cancer treatment. *Cancer discovery* 2015 Aug;5(8):832-41.
22. Ardini E, Bosotti R, Borgia AL, et al. The TPM3-NTRK1 rearrangement is a recurring event in colorectal carcinoma and is associated with tumor sensitivity to TRKA kinase inhibition. *Molecular oncology* 2014 Dec;8(8):1495-507.

23. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2004 Jul 22;351(4):337-45.
24. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007 Aug 1;25(22):3230-7.
25. Rolfo C, Ruiz R, Giovannetti E, et al. Entrectinib: a potent new TRK, ROS1, and ALK inhibitor. *Expert opinion on investigational drugs* 2015;24(11):1493-500.
26. Paumelle R, Tulasne D, Leroy C, Coll J, Vandebunder B, Fafeur V. Sequential activation of ERK and repression of JNK by scatter factor/hepatocyte growth factor in madin-darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2000;11(11):3751-63.
27. Makarova O, Kamberov E, Margolis B. Generation of deletion and point mutations with one primer in a single cloning step. *BioTechniques* 2000 Nov;29(5):970-2.
28. Tulasne D, Paumelle R, Weidner KM, Vandebunder B, Fafeur V. The multisubstrate docking site of the MET receptor is dispensable for MET-mediated RAS signaling and cell scattering. *Mol Biol Cell* 1999 Mar;10(3):551-65.
29. Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nature genetics* 2013 Oct;45(10):1113-20.
30. Nieto P, Ambrogio C, Esteban-Burgos L, et al. A Braf kinase-inactive mutant induces lung adenocarcinoma. *Nature* 2017 Aug 10;548(7666):239-43.
31. Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 2010 Jan 22;140(2):209-21.
32. Del Piccolo N, Sarabipour S, Hristova K. A New Method to Study Heterodimerization of Membrane Proteins and Its Application to Fibroblast Growth Factor Receptors. *The Journal of biological chemistry* 2017 Jan 27;292(4):1288-301.
33. Nilsson I, Bahram F, Li X, et al. VEGF receptor 2/-3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts. *The EMBO journal* 2010 Apr 21;29(8):1377-88.
34. Cortot AB, Kherrouche Z, Descarpentries C, et al. Exon 14 deleted MET receptor as a new biomarker and target in cancers. *J Natl Cancer Inst* 2017 May;109(5).

Figure legends:

Figure 1: Flow chart of the experimental procedure

Diagram of the main experimental steps of the study, including (1) selection of 30 patients with metastatic colorectal cancer at the university hospitals of Caen, Lille, and Rouen in the north of France; (2) extraction and quality control of DNA from frozen healthy, tumor, and metastatic tissues; (3) NGS sequencing of all RTK exons and, as controls, KRAS, PI3KCA, and TP53; (4) bioinformatic analysis to identify somatic mutations in RTKs; (5) selection of somatic variants; (6) functional analysis, including assessment of RTK tyrosine phosphorylation and transforming potential.

Figure 2: Somatic mutations in the 58 RTKs, KRAS, PI3KCA, and TP53 in tumors and metastases of the 30 patients

Presentation of the 38 somatic mutations in RTKs and 30 somatic mutations in KRAS, PI3KCA, or TP53 absent from normal tissues but present in the colorectal tumors (green column) and/or hepatic metastases (blue column) of the 30 patients. For each variant (columns on the left), the genomic position (position), chromosome (Chr), and gene name (Gene) are supplied, The AA substitution (variant), functional domain affected (protein domain), and type of mutation (Consequence; missense, splice donor/acceptor, frameshift, stop gained) are indicated. Variants are labeled, respectively, in green, blue, or red according to their presence in the tumor, the metastatic tissue, or both.

Figure 3: Tyrosine phosphorylation of EPHA4, EPHB2, KIT and TRK with somatic mutations in the kinase domain

(A, C, E, G, I) HEK293T cells were transfected with increasing amounts of a vector expressing the WT or mutated form of the indicated RTK. The empty vector was used at 2 μ g transfecting DNA in each case. For each RTK, the same amount of protein was analyzed by western blotting with the indicated antibodies directed against either the protein itself or a fused tag (V5 or Flag). Then the blot was reprobed with an antibody directed against the phosphorylated residue(s) of the indicated RTK. Loading was assessed by reprobing with tubulin. Arrows indicate the positions of each RTK and of its tyrosine-phosphorylated form. These results are representative of three independent experiments. **(B, D, F, H, J)** The mutation of each variant (labeled with an asterisk) was inserted into the 3D structure of its kinase domain.

Figure 4: Tyrosine phosphorylation of FGFR4 and VEGFR3 with somatic mutations in the kinase domain

(A, C) HEK293T cells were transfected with increasing amounts of a vector expressing the WT or mutated form of the indicated RTK. The empty vector was used at 2 μ g transfecting DNA in each case. For each RTK, the same amount of protein was analyzed by western blotting with the indicated antibodies. Then the blot was reprobed with an antibody directed against the phosphorylated residue(s) of the indicated RTK. Loading was assessed by reprobing with tubulin. Arrows indicate the positions of each RTK and of its tyrosine-phosphorylated form. These results are representative of

three independent experiments. **(B, D)** The mutation of each variant (labeled with an asterisk) was inserted into the 3D structure of its kinase domain. For VEGFR3 (FLT4), the mutation Leu1014Phe, affecting a residue conserved in VEGFR1, was inserted into the VEGFR1 3D structure. **(E)** HCT-116 cells were transfected with 1 μ g/ml of empty vector or vector expressing WT or Leu1014Phe VEGFR3. The same amount of protein was analyzed by western blotting with antibodies directed against VEGFR3. Then the blot was reprobbed with an antibody directed against its tyrosine phosphorylated form. Loading was assessed by reprobbed with tubulin. Arrows indicate the positions of VEGFR3 and of its tyrosine-phosphorylated form.

Figure 5: Fibroblast transformation with the 8 RTKs harboring somatic mutations

NIH3T3 cells were transfected with the empty vector or with a vector expressing the indicated WT or mutated RTK or HRAS G12V as a positive control. They were cultured for 15 days in 5% serum and then fixed and stained. Transformed clones were counted. The graph shows the percentage of transformed clones relative to the number obtained with HRAS G12V.

Selection of 30 **patients** in 3 university hospitals of North of France

30 trios of tissue

- (i) Healthy (ii) Colorectal Tumor (iii) Hepatic metastasis
Anatomopathologic controls

8 patients untreated

22 patients treated

DNA extraction from frozen tissues, quality control on nanodrop

NGS Sequencing on illumina, Haloplex capture

17116 amplicons for all the exons (~230 kb)

58 RTK and KRAS, PI3KCA, TP53

- Mean of read bases per samples 2158
- Global Coverage 20.538.106.880

Analysis

- Aligement by novoalign software
- Variants Calling by freebayes software (871 variants)
- Annotation by Annovar software

Filtering

- Only somatic variants (325 variants)
- Not known as a polymorphism (321 variants)
- Not synonymous or in splicing site (233)
- High Quality (68 variants)

Selection of 10 variants for functional analysis

- Located in the kinase domain
- Present in both tumor and metastasis

Functional analysis of 8 variants on 7 RTK

- Tyrosine phosphorylation
- Transformation of NIH3T3

	Chemo-naive group	Chemo-treated group	Overall
Total number of patients	8	22	30
Age onset CRC diagnosis, y (a)			
- Mean	71,37	59,54	65,45
- Range	57-78	36-78	36-78
Gender			
Males; females	5;3	13;9	18;12
Tumor localization			
Right Colon	7	7	14
Left Colon	0	3	3
Transverse Colon	0	1	1
Sigmoid	1	8	9
Rectum	0	3	3
Time between primary tumor resection and metastasectomy, mo			
- Mean	3,4	6,24	4,82
- Range	0-34	0-26	0-34
Overall survival time, y			
- Mean	3.9 ± 1.1	5.2 ± 0.4	5.0 ± 0.4
- No. of patients who died from disease	3	9	12
Chemotherapeutic schedule (b)			
Folfiri	-	2	2
Folfiri+Avastin	-	5	5
Folfox	-	9	9
Folfox+Avastin	-	2	2
Xelox	-	1	1
Erbitux + Xelox (Xeloda-Oxaliplatine)	-	1	1
Folfox + LV5 FU2	-	1	1
Xeloda + 5FU/Leucoverine	-	1	1
pTNM classification			
T3	4	16	20
T4	3	3	6
T4b	1	-	1
Nx	1	-	1
N0	3	10	13
N1	5	4	9
N1a	1	-	1
N1b	1	-	1
N2	-	2	2
N2a	1	-	1
N2b	1	-	1
Mx	1	5	6
M1	6	15	21
M1b	-	1	1
M2	-	-	-

Table 1: Clinical data pertaining to the 30 patients with metastatic colorectal cancer.

Some patients had received chemotherapy (chemo-treated) and others, not (chemo-naïve). For the former patients, the chemotherapy administered and treatment schedule are detailed. Patient gender and age at diagnosis are indicated. Primary tumor location and the time in months between tumor and metastasis resection are detailed, as is the pTNM classification. Overall survival in years is presented.

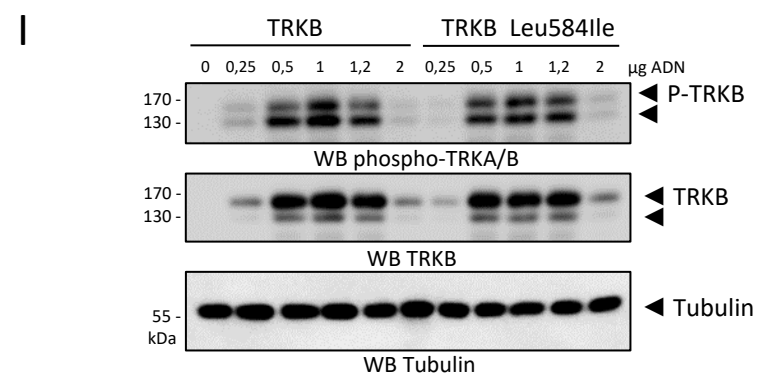
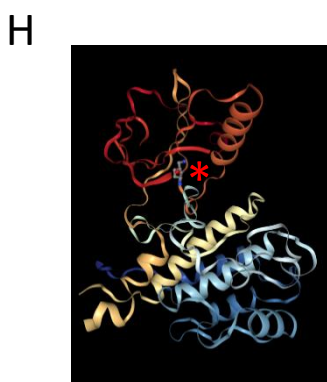
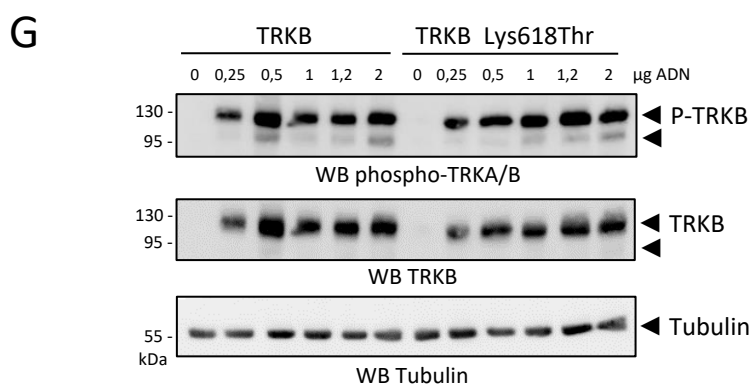
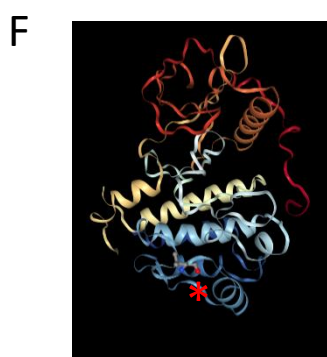
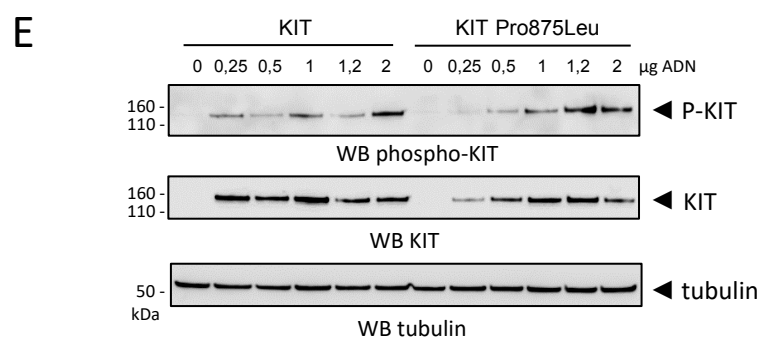
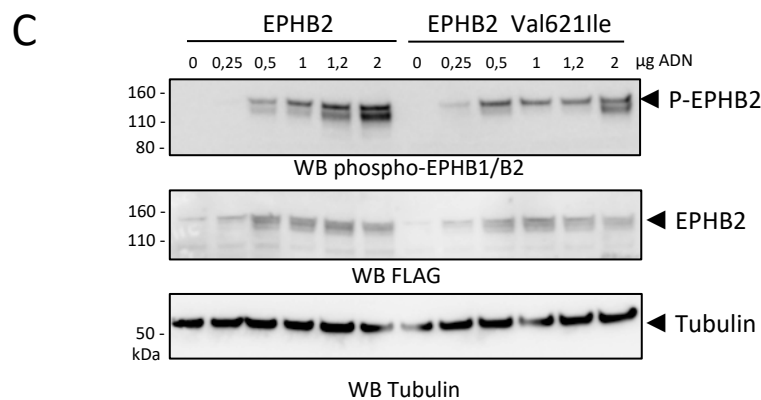
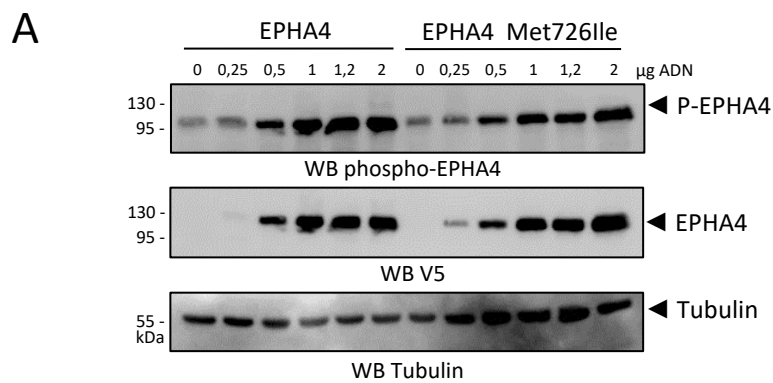


Figure 3

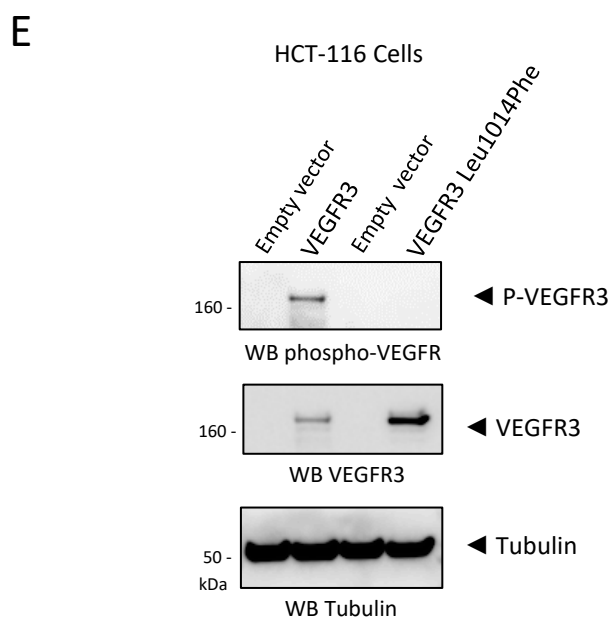
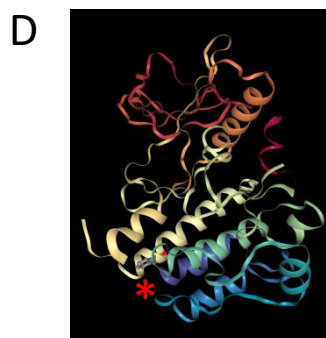
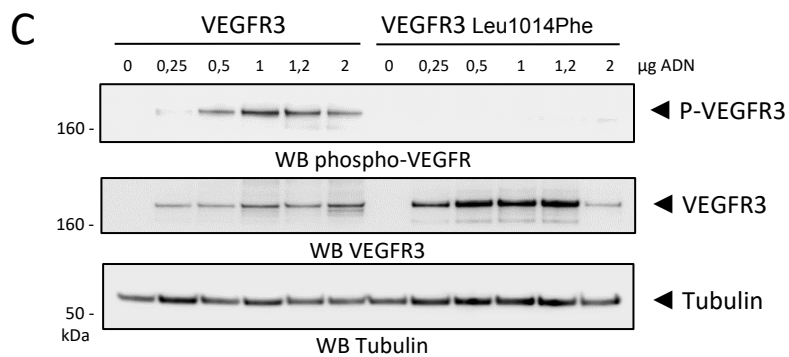
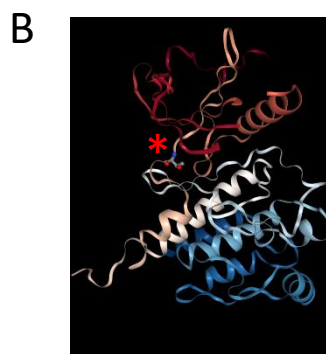
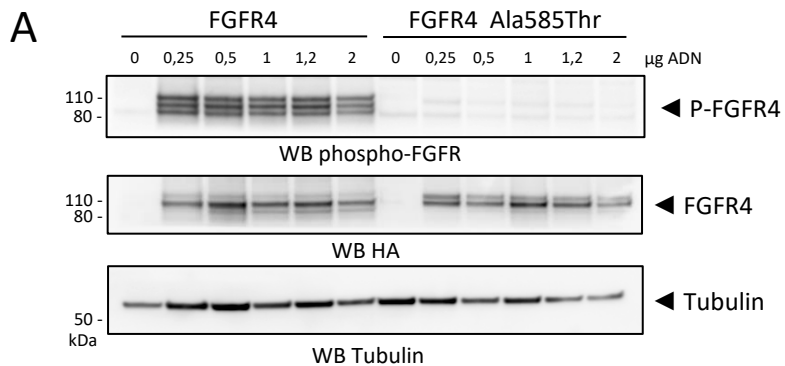


Figure 4

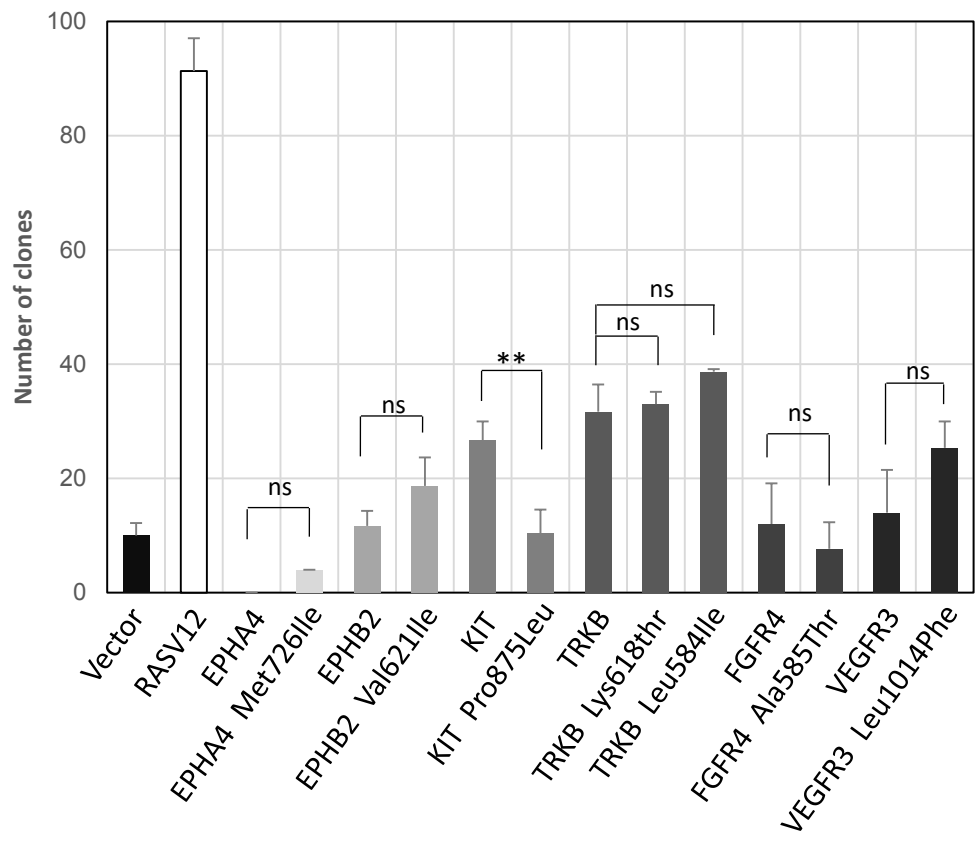


Figure 5

3. Discussion

3.1 L'analyse par séquençage haut débit

L'introduction des séquençages de nouvelle génération (*NGS, next-generation sequencing*) a considérablement réduit le temps et les coûts associés à l'analyse du génome. Dans le domaine de la recherche sur le cancer, le NGS a permis d'identifier de nouvelles mutations et de mettre en évidence qu'un grand nombre de mutations touchent les RTKs. Désormais, ces techniques de séquençage haut débit sont fréquemment utilisées sur les plateformes hospitalières de biologie moléculaire. Elles permettent notamment d'identifier les altérations moléculaires présentes chez les patients atteints de cancer dans le but de leur attribuer, si possible, des thérapies ciblées efficaces ou de sélectionner les patients candidats aux essais cliniques.

Les contrôles

Dans notre étude nous avons utilisé la technique de séquençage haut débit afin d'identifier de nouvelles mutations de RTKs dans les cancers colorectaux. En collaboration avec les hôpitaux de Caen, Lille et Rouen nous avons pu réunir des échantillons de tissus sains, de tumeur colorectale et de métastase hépatique provenant de 30 patients. L'avantage d'avoir un échantillon de tissu sain pour chaque patient nous a permis de distinguer les mutations acquises des polymorphismes individuels (mutations constitutionnelles). D'autre part, nous avons également choisi de séquencer l'ADN génomique issu de tissus métastatiques afin d'identifier les mutations présentes dans la tumeur et qui demeurent dans la métastase.

Comme contrôle de l'efficacité du séquençage nous avons ajouté au panel des 58 RTKs l'analyse de 3 gènes fréquemment retrouvés mutés dans ce type de cancers, *KRAS*, *PIK3CA* et *TP53* (Huang et al., 2018). Les résultats révèlent qu'une grande majorité des patients (27/30) présente au moins une mutation sur l'un de ces 3 gènes. Au total, 30 variants de *KRAS*, *PIK3CA* et *TP53* ont été identifiés et tous, excepté un, étaient répertoriés dans au moins une base de données (COSMIC, TCGA et ICGC). Certains variants ont été retrouvés plusieurs fois dans la cohorte comme la mutation *KRAS* G12V identifiée chez 12/30 patients. Une étude a montré, suite au séquençage d'échantillons de 164 patients atteints d'un cancer colorectal à métastases hépatiques, que la proportion de patients présentant une mutation de *KRAS*, *PIK3CA* et *TP53* étaient de 33.5, 13.4 et 60.4% respectivement (Løes et al., 2016). Dans notre étude, réalisée sur 30 patients, nous avons obtenu une proportion de 60% de patients mutés *KRAS*, 13.3% mutés *PIK3CA* et 76.6% mutés *TP53*. Toutes ces données montrent que les résultats de séquençage obtenus dans notre étude sont cohérents avec ce qui est retrouvé dans la

littérature. Nous pouvons aussi ajouter qu'environ 80 % (39/50) des mutations KRAS, PIK3CA et TP53 ont été détectées à la fois dans la tumeur et la métastase d'un même patient montrant que les mutations drivers, connues pour être impliquées dans le processus de développement tumoral, sont également présentes dans la métastase.

L'analyse des RTKs mutés

L'analyse des 58 RTKs nous a permis d'identifier 38 mutations réparties sur 20 des 30 patients analysés. Ainsi, un tiers des patients de l'étude ne présente aucune mutation de RTK ou à une trop faible fréquence pour être détectable si la tumeur est hétérogène. Parmi les mutations identifiées, la moitié d'entre elles (19/38) avait déjà été décrite auparavant validant la qualité du séquençage.

Les 38 mutations ont été identifiées sur 24 RTKs distincts. Ainsi, 9 RTKs présentent plusieurs mutations différentes tel que FGFR4, TRKB ou encore VEGFR3. A l'inverse, nous n'avons retrouvé aucune mutation pour 34 RTKs, que ce soit dans la tumeur ou la métastase. Une étude sur une plus grande cohorte pourrait identifier les RTKs les plus fréquemment mutés dans les CCR et donc ceux ayant un plus fort potentiel oncogénique.

Enfin, alors que près de 80% des mutations KRAS, PIK3CA et TP53 ont été détectées à la fois dans les tissus tumoraux et métastatiques d'un même patient, seulement 44% des mutations affectant les RTKs sont présentes dans les deux tissus (17/38). D'autre part, le reste des mutations sont presque également réparties entre tumeurs et métastases, soient 9/38 et 12/38 respectivement. Ces résultats suggèrent que, contrairement aux mutations drivers connues dans les CCR, les mutations de RTKs ne sont pas majoritairement présentes à la fois dans la tumeur et la métastases. D'autre part, le fait que nous ne retrouvons pas les mutations préférentiellement dans les métastases semble signifier qu'elles ne sont pas associées au processus métastatique.

3.2 Existe-il un lien entre la fréquence des mutations et leur impact ?

Comme évoqué précédemment, certaines mutations touchant les gènes « contrôles » ont été retrouvées plusieurs fois dans la cohorte comme la mutation KRAS G12V ou G12C identifiées chez 14/30 patients. Ces mutations ont également été identifiées à plusieurs reprises dans une autre cohorte comprenant 164 patients atteints d'un cancer colorectal à métastases hépatiques, avec 13 mutations KRAS G12V et 7 mutations KRAS G12C (Løes et al., 2016). Plusieurs études ont montré que les mutations qui touchent le codon 12 de KRAS sont les plus fréquentes et qu'elles sont associées à

un pronostic défavorable (Fiala et al., 2016; Tong et al., 2014). *In vitro*, des cellules exprimant stablement une mutation du codon 12 possèdent une résistance à l'apoptose, une perte de l'inhibition de contact et une prédisposition à la croissance sans ancrage (Guerrero et al., 2000).

A contrario, chaque mutation de RTKs identifiée dans notre étude n'a été retrouvée qu'une seule fois ce qui semble indiquer que ce sont des mutations peu fréquentes. Il est tout de même à noter que notre étude a été réalisée sur un nombre restreint de 30 patients. De surcroît, la moitié des mutations n'avait jamais été décrite auparavant et l'autre moitié est répertoriée avec une faible récurrence ce qui appuie l'hypothèse que ces mutations sont assez rares. Les résultats de l'analyse fonctionnelle révèlent que les 7 mutations étudiées ne conduisent pas à l'activation de la kinase. Nous pouvons donc supposer qu'une mutation retrouvée à une faible fréquence à un faible potentiel tumorigène.

Cependant, des études fonctionnelles récentes ont mis en évidence qu'il existe des mutations qui surviennent à un taux relativement faible et qui ont un impact sur le développement tumoral. C'est le cas, par exemple, des mutations qui affectent le récepteur ERBB4 dans les CBNPC. Tout d'abord, contrairement au récepteur MET, on ne retrouve pas de hotspots (zones où les mutations sont plus fréquentes) sur la séquence de ERBB4 (Figure 31). Pourtant, une étude fonctionnelle de 9 mutations somatiques de ERBB4, découvertes à partir d'échantillons d'adénocarcinomes pulmonaires, a montré que 4 de ces mutations provoquaient une augmentation de l'activité kinase et des capacités transformantes du récepteur (Kurppa et al., 2016). Ces 9 mutations n'ont été identifiées qu'une fois sur une totalité de 188 échantillons suggérant que la fréquence d'apparition d'une mutation n'a pas forcément de lien avec son rôle dans la tumorigénèse (Ding et al., 2008).

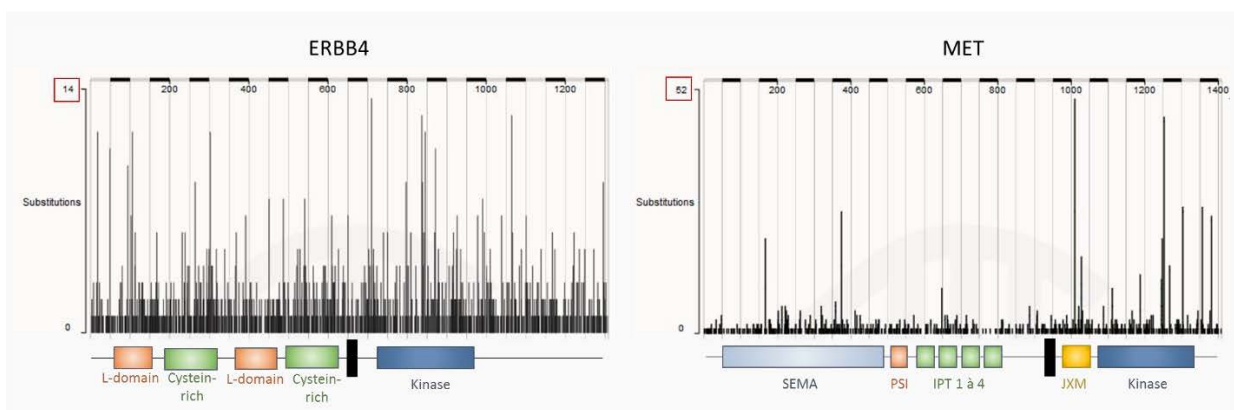


Figure 31 : Comparaison de la répartition des mutations somatiques sur la séquence des récepteurs ERBB4 et MET. L'ensemble des mutations est globalement réparti sur la totalité des séquences de ERBB4 et MET. Toutefois certains « hotspots » sont identifiables au niveau du domaine kinase, juxtamembranaire et dans une moindre mesure au niveau du domaine extracellulaire du récepteur MET, contrairement à ERBB4 où les mutations sont distribuées de manière plus homogène sur l'ensemble de la séquence. Cette figure a été réalisée d'après le site COSMIC.

D'autre part, nous avons souhaité déterminer, à partir de la base de données COSMIC, s'il existait d'autres variants (non synonymes) affectant des RTKs dans les CCR. Pour faciliter l'analyse nous nous sommes focalisés sur les 6 RTKs étudiés fonctionnellement dans l'étude, soit EPHA4, EPHB2, FGFR4, KIT, TRKB et VEGFR3. Les résultats indiquent qu'il existe beaucoup d'autres mutations touchant ces RTKs dans les CCR, avec 69 variants pour EPHA4, 139 pour EPHB2, 85 pour FGFR4, 66 pour KIT, 45 pour NTRK2 et 152 pour VEGFR3. Les mutations ont été trouvées tout au long de la séquence codante et sont présentes, là encore, avec une faible récurrence. Fait intéressant, à notre connaissance aucune étude fonctionnelle n'a été menée pour étudier leurs conséquences sur l'activation des récepteurs. À la lumière de notre étude, qui démontre qu'aucun des variants RTK testés n'active les récepteurs, nous pouvons supposer que la majorité des mutations identifiés correspondent à des mutations silencieuses et que les protéines encodées ne constituent pas des cibles adéquates pour l'utilisation de TKI. Néanmoins, il faut rester prudent car nous avons vu que des mutations peu fréquentes peuvent jouer un rôle sur la tumorigénèse. Ainsi, seules des études fonctionnelles approfondies pourront permettre de répondre à ces questions.

3.3. Les limites de la transfection transitoire

Lors de notre étude, nous avons comparé le niveau de phosphorylation de la kinase des récepteurs mutés par rapport aux récepteurs WT. Pour cela nous avons transfecté des cellules HEK293T avec différents plasmides capables d'exprimer l'une ou l'autre des versions du récepteur. Or nous avons eu beaucoup de difficultés à avoir un niveau d'expression très similaire entre les deux variants, une condition nécessaire à l'analyse comparative que nous voulions mener. C'est pour cela que nous avons réalisé des transfections avec une dose croissante d'ADN allant de 0.25 μg à 2 μg afin de multiplier les possibilités de comparaison. Cette gamme nous a permis d'analyser l'activité des récepteurs dans des cellules les exprimant avec des taux similaires et donc comparables.

D'autre part, la transfection plasmidique induit généralement une surexpression de la protéine traduite. Dans le cas des RTKs, une surexpression va conduire à la phosphorylation des résidus tyrosines kinases indépendamment de l'action de leur ligand, probablement suite à une dimérisation. Ainsi, pour certains récepteurs, comme NTRK2, nous n'avons pas pu observer d'augmentation de la phosphorylation du récepteur en réponse au ligand car, même à un faible taux d'ADN transfecté (0.25 μg), la phosphorylation était déjà très importante. D'autre part, si la surexpression du récepteur par transfection transitoire nous empêche de visualiser une réponse au ligand il est possible qu'elle puisse masquer une activation faible de la kinase induite par une mutation.

Avec le recul, nous opterions aujourd'hui pour une expression stable des différents variants par transfection ou en réalisant, par la technique du CRISP-Cas9 par exemple, la mutation sur le récepteur endogène. Ainsi, nous nous affranchirions de la différence d'expression entre les différents variants ce qui faciliterait la comparaison de leur activité kinase et éviterait la surexpression qui induit une activation constitutive des récepteurs. Cette technique a été mise au point dans le laboratoire au cours de ces derniers mois.

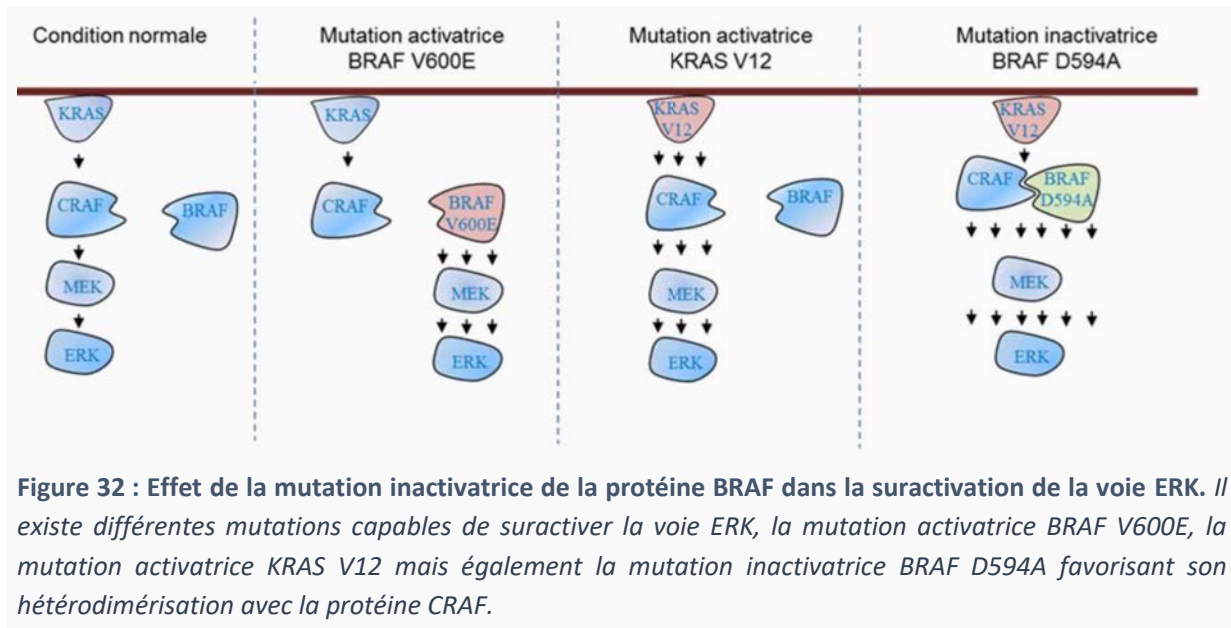
3.4. La localisation des mutations activatrices dans les RTKs

Par définition, les mutations drivers sont des mutations qui procurent un avantage sélectif essentiel pour le développement tumoral, les autres sont appelées mutations « passager ». Nous avons vu dans l'introduction que dans le cas de MET la grande majorité des mutations activatrices de la kinase se trouve sur le domaine kinase lui-même (Figure 13). C'est le cas également pour de nombreux autres RTKs. C'est pour cela que dans notre étude, afin de limiter le nombre d'analyses fonctionnelles et de maximiser les chances de trouver une mutation activatrice, nous nous sommes concentrés sur les variants de RTK situés dans le domaine kinase et présents à la fois dans la tumeur et dans la métastase. Cependant, contrairement à notre hypothèse initiale, nos données montrent que les variants testés ne causent pas d'augmentation de l'activité kinase. Comme il a été démontré que seules les mutations activatrices des RTKs sont impliquées dans la tumorigenèse, nos résultats suggèrent que les mutations étudiées ne sont pas des mutations drivers.

Cependant il serait intéressant d'étendre l'étude aux mutations situées en dehors du domaine kinase car ces mutations peuvent également influencer l'activité des RTKs. Par exemple, pour reprendre l'étude précédente avec le cas du récepteur ERBB4, parmi les 4 mutations activatrices identifiées, deux sont situées sur le domaine kinase et les deux autres se trouvent au niveau du domaine extracellulaire (Kurppa et al., 2016). L'étude démontre que les deux mutations du domaine extracellulaire favorisent l'homo et l'hétéro-dimérisation de ERBB4 conduisant à une augmentation du taux de phosphorylation du récepteur. D'autre part, il a été démontré que 3% des CBNPC présentent des mutations qui touchent les sites d'épissage de l'exon 14 de MET, codant pour le domaine juxtamembranaire, et conduisent au saut en phase de cet exon (Cortot et al., 2017). Ces résultats démontrent que, même si les mutations drivers sont plus fréquemment retrouvées dans le domaine kinase des RTKs, nous ne pouvons pas exclure que des altérations situées en dehors de ce domaine soient de potentielles mutations drivers.

3.5. Le potentiel des mutations inhibitrices

De manière intéressante, parmi les 7 mutations analysées, nous avons identifié deux mutations provoquant une diminution drastique de la phosphorylation (FGFR4-Ala585Thr et FLT4/VEGFR3-Leu1014Phe). Du fait de l'absence d'activité kinase et de l'extinction de la voie de signalisation on pourrait supposer que ces mutations ne jouent aucun rôle dans le processus de tumorigenèse. Pourtant, des études récentes démontrent qu'une mutation inactivatrice de BRAF, associée à une mutation activatrice de RAS, est à l'origine d'évènements déclencheurs de l'oncogenèse pulmonaire (Nieto et al., 2017; Yao et al., 2017). En effet, ce mutant (BRAF Asp594Ala chez l'Homme et Asp631Ala chez la souris), permet son hétérodimérisation avec la protéine CRAF ce qui favorise l'activation de celle-ci conduisant à l'activation de la voie ERK (Figure 32). Il n'est donc pas exclu que les mutations retrouvées sur les récepteurs FGFR4 et VEGFR3 soient capables de favoriser la tumorigenèse.



De plus il est intéressant de noter que les récepteurs FGFR4 et VEGFR3 appartiennent tous deux à un sous-groupe de RTK présentant une homologie de séquence avec d'autres récepteurs (FGFR1, 2, 3 et 4 et VEGFR1, 2 et 3). De nombreux RTKs sont capables de former des hétérodimères, le plus souvent avec d'autres membres d'une même famille, dont les différentes formes joueraient un rôle spécifique dans la signalisation cellulaire. Certaines études ont même démontré, dans le cas des EGFR, que l'hétéro-dimérisation pouvait augmenter leur activation et celle des voies de signalisations en aval en comparaison avec les homo-dimérisations (Olayioye et al., 2000). Dans le cas des FGFR, une étude a mis en évidence par la technique de FRET que tous les hétérodimères possibles peuvent se former et que certaines mutations, telles que les mutations A391E et G380R de FGFR3, pourraient

favoriser la formation d'hétérodimères (Del Piccolo et al., 2017). Concernant la famille des VEGFR, une étude a montré par la technique de « Proximity Ligation Assay » que les ligands VEGF-A et VEGF-C pouvaient induire la dimérisation de VEGFR2 et 3 ; un hétérodimère impliqué dans le mécanisme de « sprouting » (bourgeoisement) de l'angiogénèse (Nilsson et al., 2010).

Compte tenu de l'effet de la mutation inhibitrice de BRAF sur l'activation de CRAF, il serait intéressant d'étudier l'influence des mutations inhibitrices de FGFR4 et de VEGFR3 sur l'activité kinase des hétérodimères formés avec un autre membre de leur famille.

3.6. Ce que nous disent les mutations silencieuses

Très peu d'articles mettent en évidence l'identification de mutations n'ayant aucun impact sur l'activation du récepteur. Lorsque c'est le cas, une mutation activatrice est également présente dans la même étude et c'est elle qui est exploitée par la suite. Ceci pourrait s'expliquer par la difficulté ou le manque d'enthousiasme à publier des résultats négatifs. Pourtant, il est également crucial d'identifier les mutations non activatrices de la kinase pour pouvoir exclure les patients qui ne tireront probablement aucun bénéfice à l'utilisation de TKI.

D'autre part, pouvons-nous vraiment conclure qu'une mutation n'activant pas la kinase n'a aucun impact sur l'activité du récepteur ? J'aimerais aborder ici le cas des RTKs membres de la famille des récepteurs à dépendance car une mutation au premier abord silencieuse, car elle ne provoque pas l'activation de la kinase, pourrait induire une perte de l'activité pro-apoptotique du récepteur et être en réalité une mutation « helper ».

De manière intéressante, il se trouve que certains RTKs analysés dans notre étude et présentant des mutations silencieuses font également partie de la famille des récepteurs à dépendance ; c'est le cas par exemple des récepteurs KIT et EPHA4 (Furne et al., 2009; Wang et al., 2018). En absence son ligand l'EphrinA3, EPHA4 est clivé par la caspase 3 au niveau de l'acide aspartique D773/774 (VLED₇₇₃D₇₇₄). De ce cas précis, le fragment C-terminal libéré est inactif et c'est la partie tronquée ancrée à la membrane qui va déclencher la cascade apoptotique. Ces données suggèrent que le site impliqué dans l'apoptose se trouve en amont du site de clivage D773/774. Ainsi des mutations situées à ce niveau et initialement identifiées comme des mutations silencieuses, comme la mutation EPHA4 M726I de notre étude, pourrait finalement avoir un impact.

Comme d'autres récepteurs aux Ephrins font partie des récepteurs à dépendance, on peut supposer que le récepteur EPHB2, analysé dans étude, puisse potentiellement en faire partie. De la

même manière, il est aujourd’hui clairement établi que les récepteurs Trk-A et C sont des récepteurs à dépendance (Negulescu and Mehlen, 2018). Se pourrait-il que le récepteur Trk-B (NTRK2 dans l’étude) le soit aussi, même si pour l’instant aucune étude ne l’a démontré ?

Ainsi il faudrait vérifier que les 5 mutations « silencieuses » touchant ces récepteurs (EPHA4, EPHB2, TRK-B et KIT) ne soient pas des mutations inhibitrices de capacités pro-apoptotiques.

Conclusion

En conclusion, de nombreux événements physiopathologiques sont associés à une dérégulation de la capacité des cellules à ajuster leur équilibre survie/apoptose en réponse aux stimuli de l'environnement. Dans ce contexte, les RTKs faisant partie de la famille des récepteurs à dépendance peuvent jouer un rôle critique puisqu'ils ont la double fonction d'induire la survie ou la mort cellulaire, en présence ou non de leurs ligands.

La première étude apporte les premières preuves de la fonction de MET en tant que récepteur à dépendance *in vivo* avec un mécanisme original d'induction de l'apoptose par la régulation des flux calciques. Cette classification en tant que récepteur à dépendance montre le rôle clé de MET en tant que régulateur de l'équilibre entre la survie cellulaire et l'apoptose et semble être pertinente pour son ciblage thérapeutique. Dans les pathologies où la mort cellulaire est exacerbée, comme l'ischémie ou la stéatose hépatique, l'équilibre pourrait être rétabli en favorisant la signalisation pro-survie de MET par un traitement ectopique d'HGF/SF. A l'inverse, la mort des cellules cancéreuses, pourrait être favorisée en combinant l'inhibition de l'activité kinase de MET avec des agents favorisant son action pro-apoptotique. D'un point de vue plus large, ce travail nous permet de revoir la place des RTKs dans le cancer. Aujourd'hui les RTKs sont considérés comme des puissants oncogènes alors qu'en réalité cela est beaucoup plus complexe car certains RTKs sont également des suppresseurs de tumeurs conditionnels. La compréhension de ces deux rôles opposés est cruciale pour imaginer de nouvelles thérapies efficaces.

Dans la deuxième étude, nous avons identifié de multiples mutations originales de RTKs dans des cancers colorectaux à métastases hépatiques. Cependant, l'analyse de 7 mutations, présentes à la fois dans le tissu tumoral et métastatique et situées sur le domaine kinase du récepteur, a révélé qu'aucune d'entre elles ne provoque l'activation du RTK ni n'augmente sa capacité de transformation. Le fait que les RTKs mutés ne soient pas activés suggère qu'ils ne sont probablement pas impliqués dans la tumorigenèse et que le traitement avec des TKI les ciblant serait inefficace. Par conséquent, il semble important de mettre en place des tests fonctionnels fiables parallèlement au séquençage à haut débit afin de classer les variants identifiés comme pathogènes ou non. Ces informations fonctionnelles pourraient notamment influencer le choix d'un traitement ciblé approprié. D'autre part, ce travail nous permet de revoir nos a priori sur la localisation des mutations potentiellement drivers au sein du domaine kinase des RTKs.

Références

- Abella, J.V., Peschard, P., Naujokas, M.A., Lin, T., Saucier, C., Urbé, S., and Park, M. (2005). Met/Hepatocyte growth factor receptor ubiquitination suppresses transformation and is required for Hrs phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 9632–9645.
- Ackler, S., Mitten, M.J., Foster, K., Oleksijew, A., Refici, M., Tahir, S.K., Xiao, Y., Tse, C., Frost, D.J., Fesik, S.W., et al. (2010). The Bcl-2 inhibitor ABT-263 enhances the response of multiple chemotherapeutic regimens in hematologic tumors in vivo. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *66*, 869–880.
- Adams, J.M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* *281*, 1322–1326.
- Akkad, J., Bochum, S., and Martens, U.M. (2015). Personalized treatment for colorectal cancer: novel developments and putative therapeutic strategies. *Langenbecks Arch Surg* *400*, 129–143.
- Amaravadi, R.K., Schilder, R.J., Dy, G.K., Ma, W.W., Fetterly, G.J., Weng, D.E., Graham, M.A., Burns, J.M., Chunduru, S.K., Condon, S.M., et al. (2011). Abstract LB-406: Phase 1 study of the Smac mimetic TL32711 in adult subjects with advanced solid tumors and lymphoma to evaluate safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumor activity. *Cancer Res* *71*, LB-406-LB-406.
- An, X., Wang, F., Shao, Q., Wang, F.-H., Wang, Z.-Q., Wang, Z.-Q., Chen, C., Li, C., Luo, H.-Y., Zhang, D.-S., et al. (2014). MET amplification is not rare and predicts unfavorable clinical outcomes in patients with recurrent/metastatic gastric cancer after chemotherapy. *Cancer* *120*, 675–682.
- Ancot, F., Leroy, C., Muharram, G., Lefebvre, J., Vicogne, J., Lemiere, A., Kherrouche, Z., Foveau, B., Pourtier, A., Melnyk, O., et al. (2012). Shedding-generated Met receptor fragments can be routed to either the proteasomal or the lysosomal degradation pathway. *Traffic* *13*, 1261–1272.
- Andermarcher, E., Surani, M.A., and Gherardi, E. (1996). Co-expression of the HGF/SF and c-met genes during early mouse embryogenesis precedes reciprocal expression in adjacent tissues during organogenesis. *Dev. Genet.* *18*, 254–266.
- Aouacheria, A., Rech de Laval, V., Combet, C., and Hardwick, J.M. (2013). Evolution of Bcl-2 homology motifs: homology versus homoplasy. *Trends in Cell Biology* *23*, 103–111.
- Ardini, E., Bosotti, R., Borgia, A.L., De Ponti, C., Somaschini, A., Cammarota, R., Amboldi, N., Radrizzani, L., Milani, A., Magnaghi, P., et al. (2014). The TPM3-NTRK1 rearrangement is a recurring event in colorectal carcinoma and is associated with tumor sensitivity to TRKA kinase inhibition. *Mol Oncol* *8*, 1495–1507.
- Ardizzoni, A., and Tiseo, M. (2007). Combination of target agents: challenges and opportunities. *J Thorac Oncol* *2*, S4-6.
- Arrieta, O., Garcia, E., Guevara, P., Garcia-Navarrete, R., Ondarza, R., Rembao, D., and Sotelo, J. (2002). Hepatocyte growth factor is associated with poor prognosis of malignant gliomas and is a predictor for recurrence of meningioma. *Cancer* *94*, 3210–3218.
- Asaoka, Y., Tada, M., Ikenoue, T., Seto, M., Imai, M., Miyabayashi, K., Yamamoto, K., Yamamoto, S., Kudo, Y., Mohri, D., et al. (2010). Gastric cancer cell line Hs746T harbors a splice site mutation of c-Met causing juxtamembrane domain deletion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *394*, 1042–1046.

- Bae, S., Jung, J.H., Kim, K., An, I.-S., Kim, S.-Y., Lee, J.H., Park, I.-C., Jin, Y.-W., Lee, S.-J., and An, S. (2012). TRIAD1 inhibits MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation. *FEBS Lett.* *586*, 3057–3063.
- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W., et al. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* *434*, 658–662.
- Bao, Z.-S., Chen, H.-M., Yang, M.-Y., Zhang, C.-B., Yu, K., Ye, W.-L., Hu, B.-Q., Yan, W., Zhang, W., Akers, J., et al. (2014). RNA-seq of 272 gliomas revealed a novel, recurrent PTPRZ1-MET fusion transcript in secondary glioblastomas. *Genome Res.* *24*, 1765–1773.
- Bardelli, A., Corso, S., Bertotti, A., Hobor, S., Valtorta, E., Siravegna, G., Sartore-Bianchi, A., Scala, E., Cassingena, A., Zecchin, D., et al. (2013). Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discov* *3*, 658–673.
- Basilico, C., Arnesano, A., Galluzzo, M., Comoglio, P.M., and Michieli, P. (2008). A high affinity hepatocyte growth factor-binding site in the immunoglobulin-like region of Met. *J. Biol. Chem.* *283*, 21267–21277.
- Baughman, J.M., Perocchi, F., Girgis, H.S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C.A., Sancak, Y., Bao, X.R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R.L., et al. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* *476*, 341–345.
- Baumgartner, H.K., Gerasimenko, J.V., Thorne, C., Ferdek, P., Pozzan, T., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., Sutton, R., Watson, A.J.M., and Gerasimenko, O.V. (2009). Calcium elevation in mitochondria is the main Ca²⁺ requirement for mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening. *J. Biol. Chem.* *284*, 20796–20803.
- Bernardi, P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* *79*, 1127–1155.
- Bernet, A., Mazelin, L., Coissieux, M.-M., Gadot, N., Ackerman, S.L., Scoazec, J.-Y., and Mehlen, P. (2007). Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. *Gastroenterology* *133*, 1840–1848.
- Bertotti, A., Burbridge, M.F., Gastaldi, S., Galimi, F., Torti, D., Medico, E., Giordano, S., Corso, S., Rolland-Valognes, G., Lockhart, B.P., et al. (2009). Only a subset of Met-activated pathways are required to sustain oncogene addiction. *Sci Signal* *2*, ra80.
- Beutner, G., Rück, A., Riede, B., and Brdiczka, D. (1998). Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim. Biophys. Acta* *1368*, 7–18.
- Billger, M., Wallin, M., and Karlsson, J.O. (1988). Proteolysis of tubulin and microtubule-associated proteins 1 and 2 by calpain I and II. Difference in sensitivity of assembled and disassembled microtubules. *Cell Calcium* *9*, 33–44.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., and Vande Woude, G.F. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 915–925.

- Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., and Birchmeier, C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* *376*, 768–771.
- Blomgren, K., Zhu, C., Wang, X., Karlsson, J.O., Leverin, A.L., Bahr, B.A., Mallard, C., and Hagberg, H. (2001). Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of “pathological apoptosis”? *J. Biol. Chem.* *276*, 10191–10198.
- Boccaccio, C., Andò, M., Tamagnone, L., Bardelli, A., Michieli, P., Battistini, C., and Comoglio, P.M. (1998). Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* *391*, 285–288.
- Boland, J.M., Jang, J.S., Li, J., Lee, A.M., Wampfler, J.A., Erickson-Johnson, M.R., Soares, I., Yang, P., Jen, J., Oliveira, A.M., et al. (2013). MET and EGFR mutations identified in ALK-rearranged pulmonary adenocarcinoma: molecular analysis of 25 ALK-positive cases. *J Thorac Oncol* *8*, 574–581.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* *85*, 803–815.
- Bonora, M., Bononi, A., De Marchi, E., Giorgi, C., Lebedzinska, M., Marchi, S., Patergnani, S., Rimessi, A., Suski, J.M., Wojtala, A., et al. (2013). Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle* *12*, 674–683.
- Bordeaux, M.C., Forcet, C., Granger, L., Corset, V., Bidaud, C., Billaud, M., Bredesen, D.E., Edery, P., and Mehlen, P. (2000). The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *EMBO J.* *19*, 4056–4063.
- Borowiak, M., Garratt, A.N., Wüstefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C., and Birchmeier, C. (2004). Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 10608–10613.
- Bottaro, D.P., Rubin, J.S., Falletto, D.L., Chan, A.M., Kmiecik, T.E., Vande Woude, G.F., and Aaronson, S.A. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* *251*, 802–804.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.*
- Brinkmann, V., Foroutan, H., Sachs, M., Weidner, K.M., and Birchmeier, W. (1995). Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells. *J. Cell Biol.* *131*, 1573–1586.
- de Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* *456*, 605–610.
- Buggy, Y., Maguire, T.M., McGreal, G., McDermott, E., Hill, A.D.K., O’Higgins, N., and Duffy, M.J. (2004). Overexpression of the Ets-1 transcription factor in human breast cancer. *Br. J. Cancer* *91*, 1308–1315.
- Burel-Vandenbos, F., Ngo-Mai, M., Dadone, B., Di Mauro, I., Gimet, S., Saada-Bouزيد, E., Bourg, V., Almairac, F., Fontaine, D., Virolle, T., et al. (2017). MET immunolabelling is a useful predictive tool for MET gene amplification in glioblastoma. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *43*, 252–266.

- Calvi, C., Podowski, M., Lopez-Mercado, A., Metzger, S., Misono, K., Malinina, A., Dikeman, D., Poonyagariyon, H., Ynalvez, L., Derakhshandeh, R., et al. (2013). Hepatocyte growth factor, a determinant of airspace homeostasis in the murine lung. *PLoS Genet.* *9*, e1003228.
- Camidge, D.R., Ou, S.-H.I., Shapiro, G., Otterson, G.A., Villaruz, L.C., Villalona-Calero, M.A., Iafrate, A.J., Varella-Garcia, M., Dacic, S., Cardarella, S., et al. (2014). Efficacy and safety of crizotinib in patients with advanced c-MET-amplified non-small cell lung cancer (NSCLC). *JCO* *32*, 8001–8001.
- Camp, R.L., Rimm, E.B., and Rimm, D.L. Met expression is associated with poor outcome in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* *86*, 2259–2265.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* *511*, 543–550.
- Caparica, R., Yen, C.T., Coudry, R., Ou, S.-H.I., Varella-Garcia, M., Camidge, D.R., and de Castro, G. (2017). Responses to Crizotinib Can Occur in High-Level MET -Amplified Non-Small Cell Lung Cancer Independent of MET Exon 14 Alterations. *Journal of Thoracic Oncology* *12*, 141–144.
- Cárdenas, C., Miller, R.A., Smith, I., Bui, T., Molgó, J., Müller, M., Vais, H., Cheung, K.-H., Yang, J., Parker, I., et al. (2010). Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria. *Cell* *142*, 270–283.
- Carpenter, G., Lembach, K.J., Morrison, M.M., and Cohen, S. (1975). Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *250*, 4297–4304.
- Castets, M., Broutier, L., Molin, Y., Brevet, M., Chazot, G., Gadot, N., Paquet, A., Mazelin, L., Jarrosson-Wuilleme, L., Scoazec, J.-Y., et al. (2012). DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature* *482*, 534–537.
- Catenacci, D.V.T., Ang, A., Liao, W.-L., Shen, J., O’Day, E., Loberg, R.D., Cecchi, F., Hembrough, T., Ruzzo, A., and Graziano, F. (2017a). MET tyrosine kinase receptor expression and amplification as prognostic biomarkers of survival in gastroesophageal adenocarcinoma. *Cancer* *123*, 1061–1070.
- Catenacci, D.V.T., Tebbutt, N.C., Davidenko, I., Murad, A.M., Al-Batran, S.-E., Ilson, D.H., Tjulandin, S., Gotovkin, E., Karaszewska, B., Bondarenko, I., et al. (2017b). Rilotumumab plus epirubicin, cisplatin, and capecitabine as first-line therapy in advanced MET-positive gastric or gastro-oesophageal junction cancer (RILOMET-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *18*, 1467–1482.
- Chaudhary, S.C., Cho, M.-G., Nguyen, T.T., Park, K.-S., Kwon, M.-H., and Lee, J.-H. (2014). A putative pH-dependent nuclear localization signal in the juxtamembrane region of c-Met. *Exp. Mol. Med.* *46*, e119.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* *160*, 189–200.
- Chen, H.-M., Yu, K., Tang, X., Bao, Z., Jiang, T., Fan, X.-L., Chen, X.-W., and Su, X.-D. (2015). Enhanced expression and phosphorylation of the MET oncoprotein by glioma-specific PTPRZ1-MET fusions. *FEBS Lett.* *589*, 1437–1443.

- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* *17*, 393–403.
- Chen, R., Valencia, I., Zhong, F., McColl, K.S., Roderick, H.L., Bootman, M.D., Berridge, M.J., Conway, S.J., Holmes, A.B., Mignery, G.A., et al. (2004). Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J. Cell Biol.* *166*, 193–203.
- Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S.J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* *8*, 705–711.
- Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A.B., Ebb, R.G., Gallo, G.J., Elangovan, B., Chinnadurai, G., and Lutz, R.J. (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.* *14*, 5589–5596.
- Chmielowiec, J., Borowiak, M., Morkel, M., Stradal, T., Munz, B., Werner, S., Wehland, J., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2007). c-Met is essential for wound healing in the skin. *J. Cell Biol.* *177*, 151–162.
- Choueiri, T.K., Vaishampayan, U., Rosenberg, J.E., Logan, T.F., Harzstark, A.L., Bukowski, R.M., Rini, B.I., Srinivas, S., Stein, M.N., Adams, L.M., et al. (2013). Phase II and biomarker study of the dual MET/VEGFR2 inhibitor foretinib in patients with papillary renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* *31*, 181–186.
- Christensen, J.G., Schreck, R., Burrows, J., Kuruganti, P., Chan, E., Le, P., Chen, J., Wang, X., Ruslim, L., Blake, R., et al. (2003). A selective small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met-dependent phenotypes in vitro and exhibits cytoreductive antitumor activity in vivo. *Cancer Res.* *63*, 7345–7355.
- Comoglio, P.M., Trusolino, L., and Boccaccio, C. (2018). Known and novel roles of the MET oncogene in cancer: a coherent approach to targeted therapy. *Nat. Rev. Cancer* *18*, 341–358.
- Conradt, B. (2009). Genetic control of programmed cell death during animal development. *Annu. Rev. Genet.* *43*, 493–523.
- Cooper, C.S., Park, M., Blair, D.G., Tainsky, M.A., Huebner, K., Croce, C.M., and Vande Woude, G.F. (1984). Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* *311*, 29–33.
- Cooper, C.S., Tempest, P.R., Beckman, M.P., Heldin, C.H., and Brookes, P. (1986). Amplification and overexpression of the met gene in spontaneously transformed NIH3T3 mouse fibroblasts. *EMBO J.* *5*, 2623–2628.
- Copeland, D.E., and Dalton, A.J. (1959). An association between mitochondria and the endoplasmic reticulum in cells of the pseudobranch gland of a teleost. *J Biophys Biochem Cytol* *5*, 393–396.
- Copin, M.-C., Lesaffre, M., Berbon, M., Doublet, L., Leroy, C., Tresch, E., Porte, H., Vicogne, J., B Cortot, A., Dansin, E., et al. (2016). High-MET status in non-small cell lung tumors correlates with receptor phosphorylation but not with the serum level of soluble form. *Lung Cancer* *101*, 59–67.
- Cortot, A.B., and Jänne, P.A. (2014). Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *Eur Respir Rev* *23*, 356–366.

- Cortot, A.B., Kherrouche, Z., Descarpentries, C., Wislez, M., Baldacci, S., Furlan, A., and Tulasne, D. (2017). Exon 14 Deleted MET Receptor as a New Biomarker and Target in Cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* *109*.
- Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 647–656.
- Coxon, A., Rex, K., Meyer, S., Sun, J., Sun, J., Chen, Q., Radinsky, R., Kendall, R., and Burgess, T.L. (2009). Soluble c-Met receptors inhibit phosphorylation of c-Met and growth of hepatocyte growth factor: c-Met-dependent tumors in animal models. *Mol Cancer Ther* *8*, 1119–1125.
- Cragg, M.S., Kuroda, J., Puthalakath, H., Huang, D.C.S., and Strasser, A. (2007). Gefitinib-induced killing of NSCLC cell lines expressing mutant EGFR requires BIM and can be enhanced by BH3 mimetics. *PLoS Med.* *4*, 1681–1689; discussion 1690.
- Cragg, M.S., Harris, C., Strasser, A., and Scott, C.L. (2009). Unleashing the power of inhibitors of oncogenic kinases through BH3 mimetics. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 321–326.
- Cramer, A., Kleiner, S., Westermann, M., Meissner, A., Lange, A., and Friedrich, K. (2005). Activation of the c-Met receptor complex in fibroblasts drives invasive cell behavior by signaling through transcription factor STAT3. *J. Cell. Biochem.* *95*, 805–816.
- Csordás, G., Thomas, A.P., and Hajnóczky, G. (1999). Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *The EMBO Journal* *18*, 96–108.
- Csordás, G., Madesh, M., Antonsson, B., and Hajnóczky, G. (2002). tcBid promotes Ca(2+) signal propagation to the mitochondria: control of Ca(2+) permeation through the outer mitochondrial membrane. *EMBO J.* *21*, 2198–2206.
- Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., Balla, T., Mannella, C.A., and Hajnóczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J. Cell Biol.* *174*, 915–921.
- Csordás, G., Várnai, P., Golenár, T., Roy, S., Purkins, G., Schneider, T.G., Balla, T., and Hajnóczky, G. (2010). Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol. Cell* *39*, 121–132.
- Cunnick, J.M., Mei, L., Doupnik, C.A., and Wu, J. (2001). Phosphotyrosines 627 and 659 of Gab1 Constitute a Bisphosphoryl Tyrosine-based Activation Motif (BTAM) Conferring Binding and Activation of SHP2. *J. Biol. Chem.* *276*, 24380–24387.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 49–63.
- Dai, Z., Zhu, W.-G., Morrison, C.D., Brena, R.M., Smiraglia, D.J., Raval, A., Wu, Y.-Z., Rush, L.J., Ross, P., Molina, J.R., et al. (2003). A comprehensive search for DNA amplification in lung cancer identifies inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 as candidate oncogenes. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 791–801.
- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S.A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2000). Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett.* *476*, 118–123.

- Davies, K.D., Ng, T.L., Estrada-Bernal, A., Le, A.T., Ennever, P.R., Camidge, D.R., Doebele, R.C., and Aisner, D.L. (2017). Dramatic Response to Crizotinib in a Patient with Lung Cancer Positive for an HLA-DRB1-MET Gene Fusion. *JCO Precis Oncol* 2017.
- Day, C.L., Smits, C., Fan, F.C., Lee, E.F., Fairlie, W.D., and Hinds, M.G. (2008). Structure of the BH3 domains from the p53-inducible BH3-only proteins Noxa and Puma in complex with Mcl-1. *J. Mol. Biol.* 380, 958–971.
- De Oliveira, A.T.T., Matos, D., Logullo, A.F., DA Silva, S.R.M., Neto, R.A., Filho, A.L., and Saad, S.S. (2009). MET Is highly expressed in advanced stages of colorectal cancer and indicates worse prognosis and mortality. *Anticancer Res.* 29, 4807–4811.
- Deheuninck, J., Foveau, B., Goormachtigh, G., Leroy, C., Ji, Z., Tulasne, D., and Fafeur, V. (2008). Caspase cleavage of the MET receptor generates an HGF interfering fragment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 573–577.
- Deheuninck, J., Goormachtigh, G., Foveau, B., Ji, Z., Leroy, C., Ancot, F., Villeret, V., Tulasne, D., and Fafeur, V. (2009). Phosphorylation of the MET receptor on juxtamembrane tyrosine residue 1001 inhibits its caspase-dependent cleavage. *Cell. Signal.* 21, 1455–1463.
- Del Piccolo, N., Sarabipour, S., and Hristova, K. (2017). A New Method to Study Heterodimerization of Membrane Proteins and Its Application to Fibroblast Growth Factor Receptors. *J. Biol. Chem.* 292, 1288–1301.
- Delbridge, A.R.D., Grabow, S., Strasser, A., and Vaux, D.L. (2016). Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nature Reviews Cancer* 16, 99–109.
- Delloye-Bourgeois, C., Brambilla, E., Coissieux, M.-M., Guenebeaud, C., Pedeux, R., Firlej, V., Cabon, F., Brambilla, C., Mehlen, P., and Bernet, A. (2009). Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 237–247.
- Denecker, G., Hoste, E., Gilbert, B., Hochepped, T., Ovaere, P., Lippens, S., Van den Broecke, C., Van Damme, P., D’Herde, K., Hachem, J.-P., et al. (2007). Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. *Nat. Cell Biol.* 9, 666–674.
- Descarpentries, C., Leprêtre, F., Escande, F., Kherrouche, Z., Figeac, M., Sebda, S., Baldacci, S., Grégoire, V., Jamme, P., Copin, M.-C., et al. (2018). Optimization of routine testing for MET exon 14 splice site mutations in non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol.*
- Deveraux, Q.L., and Reed, J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13, 239–252.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300–304.
- Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Arsdale, T.V., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *The EMBO Journal* 17, 2215–2223.
- Di Renzo, M.F., Olivero, M., Giacomini, A., Porte, H., Chastre, E., Mirossay, L., Nordlinger, B., Bretti, S., Bottardi, S., and Giordano, S. (1995). Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 1, 147–154.

- Dickens, L.S., Powley, I.R., Hughes, M.A., and MacFarlane, M. (2012). The “complexities” of life and death: death receptor signalling platforms. *Exp. Cell Res.* *318*, 1269–1277.
- Ding, L., Getz, G., Wheeler, D.A., Mardis, E.R., McLellan, M.D., Cibulskis, K., Sougnez, C., Greulich, H., Muzny, D.M., Morgan, M.B., et al. (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* *455*, 1069–1075.
- Du, Z., and Lovly, C.M. (2018). Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol. Cancer* *17*, 58.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* *102*, 33–42.
- Du, Y., Yamaguchi, H., Wei, Y., Hsu, J.L., Wang, H.-L., Hsu, Y.-H., Lin, W.-C., Yu, W.-H., Leonard, P.G., Lee, G.R., et al. (2016). Blocking c-Met-mediated PARP1 phosphorylation enhances anti-tumor effects of PARP inhibitors. *Nat. Med.* *22*, 194–201.
- Dueber, E.C., Schoeffler, A.J., Lingel, A., Elliott, J.M., Fedorova, A.V., Giannetti, A.M., Zobel, K., Maurer, B., Varfolomeev, E., Wu, P., et al. (2011). Antagonists induce a conformational change in cIAP1 that promotes autoubiquitination. *Science* *334*, 376–380.
- Dumartin, L., Quemener, C., Laklai, H., Herbert, J., Bicknell, R., Bousquet, C., Pyronnet, S., Castronovo, V., Schilling, M.K., Bikfalvi, A., et al. (2010). Netrin-1 mediates early events in pancreatic adenocarcinoma progression, acting on tumor and endothelial cells. *Gastroenterology* *138*, 1595–1606.e1-8.
- Duplaquet, L., Kherrouche, Z., Baldacci, S., Jamme, P., Cortot, A.B., Copin, M.-C., and Tulasne, D. (2018). The multiple paths towards MET receptor addiction in cancer. *Oncogene*.
- Durinck, S., Stawiski, E.W., Pavía-Jiménez, A., Modrusan, Z., Kapur, P., Jaiswal, B.S., Zhang, N., Toffessi-Tcheuyap, V., Nguyen, T.T., Pahuja, K.B., et al. (2015). Spectrum of diverse genomic alterations define non-clear cell renal carcinoma subtypes. *Nat. Genet.* *47*, 13–21.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 383–424.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* *145*, 104–116.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* *35*, 495–516.
- Engelman, J.A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J.O., Lindeman, N., Gale, C.-M., Zhao, X., Christensen, J., et al. (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* *316*, 1039–1043.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J.C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 929–935.
- Fazeli, A., Dickinson, S.L., Hermiston, M.L., Tighe, R.V., Steen, R.G., Small, C.G., Stoeckli, E.T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., et al. (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* *386*, 796–804.

Fearon, E.R., Cho, K.R., Nigro, J.M., Kern, S.E., Simons, J.W., Ruppert, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Thomas, G., and Kinzler, K.W. (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247, 49–56.

Fiala, O., Buchler, T., Mohelnikova-Duchonova, B., Melichar, B., Matejka, V.M., Holubec, L., Kulhankova, J., Bortlicek, Z., Bartouskova, M., Liska, V., et al. (2016). G12V and G12A KRAS mutations are associated with poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab. *Tumour Biol.* 37, 6823–6830.

Fischer, U., Jänicke, R.U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 10, 76–100.

Fitamant, J., Guenebeaud, C., Coissieux, M.-M., Guix, C., Treilleux, I., Scoazec, J.-Y., Bachelot, T., Bernet, A., and Mehlen, P. (2008). Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *PNAS* 105, 4850–4855.

Forcet, C., Ye, X., Granger, L., Corset, V., Shin, H., Bredesen, D.E., and Mehlen, P. (2001). The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 3416–3421.

Foveau, B., Leroy, C., Ancot, F., Deheuninck, J., Ji, Z., Fafeur, V., and Tulasne, D. (2007). Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ.* 14, 752–764.

Foveau, B., Ancot, F., Leroy, C., Petrelli, A., Reiss, K., Vingtdoux, V., Giordano, S., Fafeur, V., and Tulasne, D. (2009). Down-regulation of the met receptor tyrosine kinase by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis. *Mol. Biol. Cell* 20, 2495–2507.

Frampton, G.M., Ali, S.M., Rosenzweig, M., Chmielecki, J., Lu, X., Bauer, T.M., Akimov, M., Bufill, J.A., Lee, C., Jentz, D., et al. (2015). Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov* 5, 850–859.

Franke, W.W., and Kartenbeck, J. (1971). Outer mitochondrial membrane continuous with endoplasmic reticulum. *Protoplasma* 73, 35–41.

Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science* 334, 358–362.

Fuchs, Y., and Steller, H. (2011). Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell* 147, 742–758.

Fuentes-Prior, P., and Salvesen, G.S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* 384, 201–232.

Fulda, S. (2015). Smac mimetics as IAP antagonists. *Semin. Cell Dev. Biol.* 39, 132–138.

Fulda, S., and Vucic, D. (2012). Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 11, 109–124.

Furlan, A., and Tulasne, D. (2014). How does met regulate the survival/apoptosis balance? *Hepatology* 60, 1108–1109.

Furlan, A., Stagni, V., Hussain, A., Richelme, S., Conti, F., Prodosmo, A., Destro, A., Roncalli, M., Barilà, D., and Maina, F. (2011). Abl interconnects oncogenic Met and p53 core pathways in cancer cells. *Cell Death Differ.* *18*, 1608–1616.

Furlan, A., Lamballe, F., Stagni, V., Hussain, A., Richelme, S., Prodosmo, A., Moumen, A., Brun, C., Del Barco Barrantes, I., Arthur, J.S.C., et al. (2012). Met acts through Abl to regulate p53 transcriptional outcomes and cell survival in the developing liver. *J. Hepatol.* *57*, 1292–1298.

Furlan, A., Kherrouche, Z., Montagne, R., Copin, M.-C., and Tulasne, D. (2014). Thirty years of research on met receptor to move a biomarker from bench to bedside. *Cancer Res.* *74*, 6737–6744.

Furne, C., Ricard, J., Cabrera, J.R., Pays, L., Bethea, J.R., Mehlen, P., and Liebl, D.J. (2009). EphrinB3 is an anti-apoptotic ligand that inhibits the dependence receptor functions of EphA4 receptors during adult neurogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 231–238.

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* *25*, 486–541.

Gandino, L., Longati, P., Medico, E., Prat, M., and Comoglio, P.M. (1994). Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *J. Biol. Chem.* *269*, 1815–1820.

Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R., and Lemke, G. (1995). Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* *378*, 390–394.

Germain, M., Affar, E.B., D'Amours, D., Dixit, V.M., Salvesen, G.S., and Poirier, G.G. (1999). Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J. Biol. Chem.* *274*, 28379–28384.

Gherardi, E., and Stoker, M. (1990). Hepatocytes and scatter factor. *Nature* *346*, 228.

Gherardi, E., Youles, M.E., Miguel, R.N., Blundell, T.L., Iamelle, L., Gough, J., Bandyopadhyay, A., Hartmann, G., and Butler, P.J.G. (2003). Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 12039–12044.

Gherardi, E., Sandin, S., Petoukhov, M.V., Finch, J., Youles, M.E., Ofverstedt, L.-G., Miguel, R.N., Blundell, T.L., Vande Woude, G.F., Skoglund, U., et al. (2006). Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 4046–4051.

Gherardi, E., Birchmeier, W., Birchmeier, C., and Vande Woude, G. (2012). Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 89–103.

Ghoussoub, R.A., Dillon, D.A., D'Aquila, T., Rimm, E.B., Fearon, E.R., and Rimm, D.L. (1998). Expression of c-met is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma. *Cancer* *82*, 1513–1520.

Giglio, S., and Vecchione, A. (2015). c-Met and miRs in Cancer. *Biomedicines* *3*, 32–44.

Giordano, S., Di Renzo, M.F., Narsimhan, R.P., Cooper, C.S., Rosa, C., and Comoglio, P.M. (1989). Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene. *Oncogene* *4*, 1383–1388.

- Giorgi, C., Baldassari, F., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Marchi, S., Missiroli, S., Patergnani, S., Rimessi, A., Suski, J.M., et al. (2012). Mitochondrial Ca²⁺ and apoptosis. *Cell Calcium* 52, 36–43.
- Go, H., Jeon, Y.K., Park, H.J., Sung, S.-W., Seo, J.-W., and Chung, D.H. (2010). High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 5, 305–313.
- Goldschneider, D., and Mehlen, P. (2010). Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* 29, 1865–1882.
- Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P.H., and Lavrik, I.N. (2005). c-FLIP_R, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280, 14507–14513.
- Gong, Y., Somwar, R., Politi, K., Balak, M., Chmielecki, J., Jiang, X., and Pao, W. (2007). Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas. *PLoS Med.* 4, e294.
- Graham, D.M., Coyle, V.M., Kennedy, R.D., and Wilson, R.H. (2016). Molecular Subtypes and Personalized Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 12, 141–150.
- Graveel, C., Su, Y., Koeman, J., Wang, L.-M., Tessarollo, L., Fiscella, M., Birchmeier, C., Swiatek, P., Bronson, R., and Vande Woude, G. (2004). Activating Met mutations produce unique tumor profiles in mice with selective duplication of the mutant allele. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 17198–17203.
- Gridelli, C., Peters, S., Sgambato, A., Casaluce, F., Adjei, A.A., and Ciardiello, F. (2014). ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer Treat. Rev.* 40, 300–306.
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C., and Korsmeyer, S.J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* 17, 3878–3885.
- Gual, P., Giordano, S., Williams, T.A., Rocchi, S., Van Obberghen, E., and Comoglio, P.M. (2000). Sustained recruitment of phospholipase C-gamma to Gab1 is required for HGF-induced branching tubulogenesis. *Oncogene* 19, 1509–1518.
- Guerrero, S., Casanova, I., Farré, L., Mazo, A., Capellà, G., and Mangués, R. (2000). K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer Res.* 60, 6750–6756.
- Guo, B., Cen, H., Tan, X., Liu, W., and Ke, Q. (2014). Prognostic value of MET gene copy number and protein expression in patients with surgically resected non-small cell lung cancer: a meta-analysis of published literatures. *PLoS ONE* 9, e99399.
- Gupta, A., Karakiewicz, P.I., Roehrborn, C.G., Lotan, Y., Zlotta, A.R., and Shariat, S.F. (2008). Predictive value of plasma hepatocyte growth factor/scatter factor levels in patients with clinically localized prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 7385–7390.
- Guy, P.M., Platko, J.V., Cantley, L.C., Cerione, R.A., and Carraway, K.L. (1994). Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 8132–8136.

- Hackenbrock, C.R. (1966). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J. Cell Biol.* 30, 269–297.
- Halestrap, A.P., and Davidson, A.M. (1990). Inhibition of Ca²⁺-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochemical Journal* 268, 153–160.
- Hammond, D.E., Carter, S., McCullough, J., Urbé, S., Vande Woude, G., and Clague, M.J. (2003). Endosomal dynamics of Met determine signaling output. *Mol. Biol. Cell* 14, 1346–1354.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Harding, H.P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271–274.
- Hartmann, G., Prospero, T., Brinkmann, V., Ozcelik, C., Winter, G., Hepple, J., Batley, S., Bladt, F., Sachs, M., Birchmeier, C., et al. (1998). Engineered mutants of HGF/SF with reduced binding to heparan sulphate proteoglycans, decreased clearance and enhanced activity in vivo. *Curr. Biol.* 8, 125–134.
- Hashigasako, A., Machide, M., Nakamura, T., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (2004). Bi-directional regulation of Ser-985 phosphorylation of c-met via protein kinase C and protein phosphatase 2A involves c-Met activation and cellular responsiveness to hepatocyte growth factor. *J. Biol. Chem.* 279, 26445–26452.
- Heideman, D.A., Snijders, P.J., Bloemena, E., Meijer, C.J., Offerhaus, G.J., Meuwissen, S.G., Gerritsen, W.R., and Craanen, M.E. (2001). Absence of tpr-met and expression of c-met in human gastric mucosa and carcinoma. *J. Pathol.* 194, 428–435.
- Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y., and Mills, G.B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4, 988–1004.
- Hikita, H., Takehara, T., Shimizu, S., Kodama, T., Shigekawa, M., Iwase, K., Hosui, A., Miyagi, T., Tatsumi, T., Ishida, H., et al. (2010). The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. *Hepatology* 52, 1310–1321.
- Huang, D., Sun, W., Zhou, Y., Li, P., Chen, F., Chen, H., Xia, D., Xu, E., Lai, M., Wu, Y., et al. (2018). Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 37, 173–187.
- Huang, T.J., Wang, J.Y., Lin, S.R., Lian, S.T., and Hsieh, J.S. (2001). Overexpression of the c-met protooncogene in human gastric carcinoma--correlation to clinical features. *Acta Oncol* 40, 638–643.
- Hubbard, S.R. (1999). Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71, 343–358.
- Hügel, R., Muendlein, A., Volbeding, L., Drexel, H., Richtig, E., Wehkamp, U., Painsi, C., Lange-Asschenfeldt, B., Hauschild, A., and Egberts, F. (2016). Serum levels of hepatocyte growth factor as a potential tumor marker in patients with malignant melanoma. *Melanoma Res.* 26, 354–360.

- Huh, C.-G., Factor, V.M., Sánchez, A., Uchida, K., Conner, E.A., and Thorgeirsson, S.S. (2004). Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 4477–4482.
- Hunter, D.R., and Haworth, R.A. (1979). The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* *195*, 453–459.
- Ichim, G., Genevois, A.-L., Ménard, M., Yu, L.-Y., Coelho-Aguiar, J.M., Llambi, F., Jarrosson-Wuilleme, L., Lefebvre, J., Tulasne, D., Dupin, E., et al. (2013). The dependence receptor TrkC triggers mitochondria-dependent apoptosis upon Cobra-1 recruitment. *Mol. Cell* *51*, 632–646.
- Imoto, I., Tsuda, H., Hirasawa, A., Miura, M., Sakamoto, M., Hirohashi, S., and Inazawa, J. (2002). Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy. *Cancer Res.* *62*, 4860–4866.
- Indran, I.R., Tufo, G., Pervaiz, S., and Brenner, C. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1807*, 735–745.
- Infante, J.R., Dees, E.C., Olszanski, A.J., Dhuria, S.V., Sen, S., Cameron, S., and Cohen, R.B. (2014). Phase I dose-escalation study of LCL161, an oral inhibitor of apoptosis proteins inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* *32*, 3103–3110.
- International Cancer Genome Consortium PedBrain Tumor Project (2016). Recurrent MET fusion genes represent a drug target in pediatric glioblastoma. *Nat. Med.* *22*, 1314–1320.
- Ishibe, S., Karihaloo, A., Ma, H., Zhang, J., Marlier, A., Mitobe, M., Togawa, A., Schmitt, R., Czyczk, J., Kashgarian, M., et al. (2009). Met and the epidermal growth factor receptor act cooperatively to regulate final nephron number and maintain collecting duct morphology. *Development* *136*, 337–345.
- Iveson, T., Donehower, R.C., Davidenko, I., Tjulandin, S., Deptala, A., Harrison, M., Nirni, S., Lakshmaiah, K., Thomas, A., Jiang, Y., et al. (2014). Rilotumumab in combination with epirubicin, cisplatin, and capecitabine as first-line treatment for gastric or oesophagogastric junction adenocarcinoma: an open-label, dose de-escalation phase 1b study and a double-blind, randomised phase 2 study. *Lancet Oncol.* *15*, 1007–1018.
- Jayaraman, T., and Marks, A.R. (1997). T cells deficient in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are resistant to apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 3005–3012.
- Jayaraman, T., and Marks, A.R. (2000). Calcineurin Is Downstream of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in the Apoptotic and Cell Growth Pathways. *J. Biol. Chem.* *275*, 6417–6420.
- Jayasankar, V., Woo, Y.J., Pirolli, T.J., Bish, L.T., Berry, M.F., Burdick, J., Gardner, T.J., and Sweeney, H.L. (2005). Induction of angiogenesis and inhibition of apoptosis by hepatocyte growth factor effectively treats postischemic heart failure. *J Card Surg* *20*, 93–101.
- Jeffers, M., Schmidt, L., Nakaigawa, N., Webb, C.P., Weirich, G., Kishida, T., Zbar, B., and Vande Woude, G.F. (1997). Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 11445–11450.
- Jeffers, M., Fiscella, M., Webb, C.P., Anver, M., Koochekpour, S., and Vande Woude, G.F. (1998). The mutationally activated Met receptor mediates motility and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 14417–14422.

- Jenkins, R.W., Oxnard, G.R., Elkin, S., Sullivan, E.K., Carter, J.L., and Barbie, D.A. (2015). Response to Crizotinib in a Patient With Lung Adenocarcinoma Harboring a MET Splice Site Mutation. *Clin Lung Cancer* 16, e101-104.
- Joffe, C., Barrow, R., Ménard, L., Calleja, V., Hart, I.R., and Kermorgant, S. (2011). A direct role for Met endocytosis in tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* 13, 827–837.
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., and Lowe, S.W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108, 153–164.
- Jorge, S.E., Schulman, S., Freed, J.A., VanderLaan, P.A., Rangachari, D., Kobayashi, S.S., Huberman, M.S., and Costa, D.B. (2015). Responses to the multitargeted MET/ALK/ROS1 inhibitor crizotinib and co-occurring mutations in lung adenocarcinomas with MET amplification or MET exon 14 skipping mutation. *Lung Cancer* 90, 369–374.
- Julien, O., and Wells, J.A. (2017). Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* 24, 1380–1389.
- Jung, J.H., Lee, S.-M., Bae, S., Lee, S.-J., Park, I.-C., Jin, Y.-W., Lee, J.H., and An, S. (2010). Triad 1 induces apoptosis by p53 activation. *FEBS Letters* 584, 1565–1570.
- Karagonlar, Z.F., Korhan, P., and Atabey, N. (2015). Targeting c-Met in Cancer by MicroRNAs: Potential Therapeutic Applications in Hepatocellular Carcinoma. *Drug Dev. Res.* 76, 357–367.
- Kavuri, S.M., Jain, N., Galimi, F., Cottino, F., Leto, S.M., Migliardi, G., Searleman, A.C., Shen, W., Monsey, J., Trusolino, L., et al. (2015). HER2 activating mutations are targets for colorectal cancer treatment. *Cancer Discov* 5, 832–841.
- Kawaida, K., Matsumoto, K., Shimazu, H., and Nakamura, T. (1994). Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 4357–4361.
- Kemp, L.E., Mulloy, B., and Gherardi, E. (2006). Signalling by HGF/SF and Met: the role of heparan sulphate co-receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 414–417.
- Kempkensteffen, C., Hinz, S., Christoph, F., Krause, H., Magheli, A., Schrader, M., Schostak, M., Miller, K., and Weikert, S. (2008). Expression levels of the mitochondrial IAP antagonists Smac/DIABLO and Omi/HtrA2 in clear-cell renal cell carcinomas and their prognostic value. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 134, 543–550.
- Kermorgant, S., and Parker, P.J. (2008). Receptor trafficking controls weak signal delivery: a strategy used by c-Met for STAT3 nuclear accumulation. *J. Cell Biol.* 182, 855–863.
- Kermorgant, S., Aparicio, T., Dessirier, V., Lewin, M.J., and Lehy, T. (2001). Hepatocyte growth factor induces colonic cancer cell invasiveness via enhanced motility and protease overproduction. Evidence for PI3 kinase and PKC involvement. *Carcinogenesis* 22, 1035–1042.
- Kermorgant, S., Zicha, D., and Parker, P.J. (2004). PKC controls HGF-dependent c-Met traffic, signalling and cell migration. *EMBO J.* 23, 3721–3734.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239–257.

Kirichok, Y., Krapivinsky, G., and Clapham, D.E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427, 360–364.

Kirkin, V., Joos, S., and Zörnig, M. (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1644, 229–249.

Kondo, S., Ojima, H., Tsuda, H., Hashimoto, J., Morizane, C., Ikeda, M., Ueno, H., Tamura, K., Shimada, K., Kanai, Y., et al. (2013). Clinical impact of c-Met expression and its gene amplification in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Clin. Oncol.* 18, 207–213.

Kong-Beltran, M., Stamos, J., and Wickramasinghe, D. (2004). The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation. *Cancer Cell* 6, 75–84.

Kong-Beltran, M., Seshagiri, S., Zha, J., Zhu, W., Bhawe, K., Mendoza, N., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Fu, L., et al. (2006). Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer Res.* 66, 283–289.

Koochekpour, S., Jeffers, M., Rulong, S., Taylor, G., Klineberg, E., Hudson, E.A., Resau, J.H., and Vande Woude, G.F. (1997). Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res.* 57, 5391–5398.

Kosai, K., Matsumoto, K., Nagata, S., Tsujimoto, Y., and Nakamura, T. (1998). Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 683–690.

Krammer, P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789–795.

Krishnaswamy, S., Kanteti, R., Duke-Cohan, J.S., Loganathan, S., Liu, W., Ma, P.C., Sattler, M., Singleton, P.A., Ramnath, N., Innocenti, F., et al. (2009). Ethnic differences and functional analysis of MET mutations in lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 15, 5714–5723.

Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* 87, 99–163.

Kroy, D.C., Schumacher, F., Ramadori, P., Hatting, M., Bergheim, I., Gassler, N., Boekschoten, M.V., Müller, M., Streetz, K.L., and Trautwein, C. (2014). Hepatocyte specific deletion of c-Met leads to the development of severe non-alcoholic steatohepatitis in mice. *J. Hepatol.* 61, 883–890.

Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P.H., and Kirchhoff, S. (2001). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* 276, 20633–20640.

Kuba, K., Matsumoto, K., Date, K., Shimura, H., Tanaka, M., and Nakamura, T. (2000). HGF/NK4, a four-kringle antagonist of hepatocyte growth factor, is an angiogenesis inhibitor that suppresses tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Res.* 60, 6737–6743.

Kurppa, K.J., Denessiouk, K., Johnson, M.S., and Elenius, K. (2016). Activating ERBB4 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 35, 1283–1291.

Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol. Cell* 17, 525–535.

- Kwak, Y., Kim, S.-I., Park, C.-K., Paek, S.H., Lee, S.-T., and Park, S.-H. (2015). C-MET overexpression and amplification in gliomas. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 14932–14938.
- Lagadic-Gossmann, D., Huc, L., and Lecureur, V. (2004). Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death and Differentiation* 11, 953–961.
- Lamballe, F., Genestine, M., Caruso, N., Arce, V., Richelme, S., Helmbacher, F., and Maina, F. (2011). Pool-specific regulation of motor neuron survival by neurotrophic support. *J. Neurosci.* 31, 11144–11158.
- Lamszus, K., Schmidt, N.O., Jin, L., Lathera, J., Zagzag, D., Way, D., Witte, M., Weinand, M., Goldberg, I.D., Westphal, M., et al. (1998). Scatter factor promotes motility of human glioma and neuromicrovascular endothelial cells. *Int. J. Cancer* 75, 19–28.
- Lanave, C., Santamaria, M., and Saccone, C. (2004). Comparative genomics: the evolutionary history of the Bcl-2 family. *Gene* 333, 71–79.
- Lathera, J., Nam, M., Rosen, E., Rao, J.S., Lamszus, K., Goldberg, I.D., and Johnston, P. (1997). Scatter factor/hepatocyte growth factor gene transfer enhances glioma growth and angiogenesis in vivo. *Lab. Invest.* 76, 565–577.
- Lavrik, I.N., Golks, A., and Krammer, P.H. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest.* 115, 2665–2672.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., and Earnshaw, W.C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346–347.
- Lee, J., Ou, S.-H.I., Lee, J.M., Kim, H.C., Hong, M., Kim, S.Y., Jang, J., Ahn, S., Kang, S.Y., Lee, S., et al. (2015). Gastrointestinal malignancies harbor actionable MET exon 14 deletions. *Oncotarget* 6, 28211–28222.
- Lee, J., Tran, P., and Klempner, S.J. (2016). Targeting the MET Pathway in Gastric and Oesophageal Cancers: Refining the Optimal Approach. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 28, e35-44.
- Lee, J.H., Han, S.U., Cho, H., Jennings, B., Gerrard, B., Dean, M., Schmidt, L., Zbar, B., and Vande Woude, G.F. (2000). A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer. *Oncogene* 19, 4947–4953.
- Lee, J.-H., Gao, C.F., Lee, C.C., Kim, M.D., and Vande Woude, G.F. (2006). An alternatively spliced form of Met receptor is tumorigenic. *Exp. Mol. Med.* 38, 565–573.
- Lee, K.F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M.C., and Hauser, C. (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378, 394–398.
- Lefebvre, J., Ancot, F., Leroy, C., Muharram, G., Lemièrre, A., and Tulasne, D. (2012). Met degradation: more than one stone to shoot a receptor down. *FASEB J.* 26, 1387–1399.
- Lefebvre, J., Muharram, G., Leroy, C., Kherrouche, Z., Montagne, R., Ichim, G., Tauszig-Delamasure, S., Chotteau-Lelievre, A., Brenner, C., Mehlen, P., et al. (2013). Caspase-generated fragment of the Met receptor favors apoptosis via the intrinsic pathway independently of its tyrosine kinase activity. *Cell Death Dis* 4, e871.

- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* *141*, 1117–1134.
- Lemmon, M.A., Schlessinger, J., and Ferguson, K.M. (2014). The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *6*, a020768.
- Lennerz, J.K., Kwak, E.L., Ackerman, A., Michael, M., Fox, S.B., Bergethon, K., Lauwers, G.Y., Christensen, J.G., Wilner, K.D., Haber, D.A., et al. (2011). MET amplification identifies a small and aggressive subgroup of esophagogastric adenocarcinoma with evidence of responsiveness to crizotinib. *J. Clin. Oncol.* *29*, 4803–4810.
- Lessene, G., Czabotar, P.E., and Colman, P.M. (2008). BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* *7*, 989–1000.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., and Korsmeyer, S.J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* *2*, 183–192.
- Li, C., Wang, X., Vais, H., Thompson, C.B., Foskett, J.K., and White, C. (2007). Apoptosis regulation by Bcl-x(L) modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel isoform gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 12565–12570.
- Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* *412*, 95–99.
- Li, N., Dou, Z., Liu, J., Chai, B., Li, Y., An, X., Chu, P., and Zhang, X. (2018). Therapeutic Effect of HGF on NASH Mice Through HGF/c-Met and JAK2-STAT3 Signalling Pathway. *Ann Hepatol* *17*, 501–510.
- Li, Y., Li, W., He, Q., Xu, Y., Ren, X., Tang, X., Wen, X., Yang, X., Sun, Y., Zeng, J., et al. (2015). Prognostic value of MET protein overexpression and gene amplification in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* *6*, 13309–13319.
- Lin, J.C., Naujokas, M., Zhu, H., Nolet, S., and Park, M. (1998). Intron-exon structure of the MET gene and cloning of an alternatively-spliced Met isoform reveals frequent exon-skipping of a single large internal exon. *Oncogene* *16*, 833–842.
- Liu, Y., and Rohrschneider, L.R. (2002). The gift of Gab. *FEBS Lett.* *515*, 1–7.
- Liu, J., Yao, F., Wu, R., Morgan, M., Thorburn, A., Finley, R.L., and Chen, Y.Q. (2002). Mediation of the DCC apoptotic signal by DIP13 alpha. *J. Biol. Chem.* *277*, 26281–26285.
- Liu, M.L., Mars, W.M., Zarnegar, R., and Michalopoulos, G.K. (1994). Collagenase pretreatment and the mitogenic effects of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-alpha in adult rat liver. *Hepatology* *19*, 1521–1527.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* *86*, 147–157.
- Liu, Y., Sun, A.M., and Dworkin, L.D. (1998). Hepatocyte growth factor protects renal epithelial cells from apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *246*, 821–826.
- Liu, Y., Zhang, Q., Ren, C., Ding, Y., Jin, G., Hu, Z., Xu, Y., and Shen, H. (2012). A germline variant N375S in MET and gastric cancer susceptibility in a Chinese population. *J Biomed Res* *26*, 315–318.

- Liu, Y.J., Shen, D., Yin, X., Gavine, P., Zhang, T., Su, X., Zhan, P., Xu, Y., Lv, J., Qian, J., et al. (2014). HER2, MET and FGFR2 oncogenic driver alterations define distinct molecular segments for targeted therapies in gastric carcinoma. *Br. J. Cancer* *110*, 1169–1178.
- Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E., and Mehlen, P. (2001). Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J.* *20*, 2715–2722.
- Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W.G., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2011). A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol. Cell* *44*, 517–531.
- Lock, L.S., Royal, I., Naujokas, M.A., and Park, M. (2000). Identification of an atypical Grb2 carboxyl-terminal SH3 domain binding site in Gab docking proteins reveals Grb2-dependent and -independent recruitment of Gab1 to receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* *275*, 31536–31545.
- Løes, I.M., Immervoll, H., Sorbye, H., Angelsen, J., Horn, A., Knappskog, S., and Lønning, P.E. (2016). Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA, TP53 status and intraindividual mutation heterogeneity on outcome after liver resection for colorectal cancer metastases. *Int J Cancer* *139*, 647–656.
- Lokker, N.A., Mark, M.R., Luis, E.A., Bennett, G.L., Robbins, K.A., Baker, J.B., and Godowski, P.J. (1992). Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *EMBO J* *11*, 2503–2510.
- Longati, P., Bardelli, A., Ponzetto, C., Naldini, L., and Comoglio, P.M. (1994). Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene* *9*, 49–57.
- Longati, P., Albero, D., and Comoglio, P.M. (1996). Hepatocyte growth factor is a pleiotropic factor protecting epithelial cells from apoptosis. *Cell Death Differ.* *3*, 23–28.
- Luo, Y., Kaz, A.M., Kannurn, S., Welsch, P., Morris, S.M., Wang, J., Lutterbaugh, J.D., Markowitz, S.D., and Grady, W.M. (2013a). NTRK3 is a potential tumor suppressor gene commonly inactivated by epigenetic mechanisms in colorectal cancer. *PLoS Genet.* *9*, e1003552.
- Luo, Y., Tsuchiya, K.D., Il Park, D., Fausel, R., Kannurn, S., Welcsh, P., Dzieciatkowski, S., Wang, J., and Grady, W.M. (2013b). RET is a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene* *32*, 2037–2047.
- Lupher, M.L., Andoniou, C.E., Bonita, D., Miyake, S., and Band, H. (1998). The c-Cbl oncoprotein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *30*, 439–444.
- Lutterbach, B., Zeng, Q., Davis, L.J., Hatch, H., Hang, G., Kohl, N.E., Gibbs, J.B., and Pan, B.-S. (2007). Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival. *Cancer Res.* *67*, 2081–2088.
- Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., et al. (2004). Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *New England Journal of Medicine* *350*, 2129–2139.
- Lyon, M., Deakin, J.A., Mizuno, K., Nakamura, T., and Gallagher, J.T. (1994). Interaction of hepatocyte growth factor with heparan sulfate. Elucidation of the major heparan sulfate structural determinants. *J. Biol. Chem.* *269*, 11216–11223.

Ma, J., Zou, C., Guo, L., Seneviratne, D.S., Tan, X., Kwon, Y.-K., An, J., Bowser, R., DeFrances, M.C., and Zarnegar, R. (2014). A novel Death Defying Domain in Met entraps the active site of Caspase-3 and blocks apoptosis in hepatocytes. *Hepatology* 59, 2010–2021.

Ma, P.C., Kijima, T., Maulik, G., Fox, E.A., Sattler, M., Griffin, J.D., Johnson, B.E., and Salgia, R. (2003). c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res.* 63, 6272–6281.

Mahjoubi, L., Gazzah, A., Besse, B., Lacroix, L., and Soria, J.-C. (2016). A never-smoker lung adenocarcinoma patient with a MET exon 14 mutation (D1028N) and a rapid partial response after crizotinib. *Invest New Drugs* 34, 397–398.

Maina, F., Casagrande, F., Audero, E., Simeone, A., Comoglio, P.M., Klein, R., and Ponzetto, C. (1996). Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* 87, 531–542.

Mao, S.A., Glorioso, J.M., and Nyberg, S.L. (2014). Liver regeneration. *Transl Res* 163, 352–362.

Mark, M.R., Lokker, N.A., Zioncheck, T.F., Luis, E.A., and Godowski, P.J. (1992). Expression and characterization of hepatocyte growth factor receptor-IgG fusion proteins. Effects of mutations in the potential proteolytic cleavage site on processing and ligand binding. *J. Biol. Chem.* 267, 26166–26171.

Maroun, C.R., Holgado-Madruga, M., Royal, I., Naujokas, M.A., Fournier, T.M., Wong, A.J., and Park, M. (1999). The Gab1 PH Domain Is Required for Localization of Gab1 at Sites of Cell-Cell Contact and Epithelial Morphogenesis Downstream from the Met Receptor Tyrosine Kinase. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1784–1799.

Mathai, J.P., Germain, M., and Shore, G.C. (2005). BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 280, 23829–23836.

Maulik, G., Shrikhande, A., Kijima, T., Ma, P.C., Morrison, P.T., and Salgia, R. (2002). Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 41–59.

Mazelin, L., Bernet, A., Bonod-Bidaud, C., Pays, L., Arnaud, S., Gespach, C., Bredesen, D.E., Scoazec, J.-Y., and Mehlen, P. (2004). Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 431, 80–84.

Mazzone, M., Basilico, C., Cavassa, S., Pennacchietti, S., Risio, M., Naldini, L., Comoglio, P.M., and Michieli, P. (2004). An uncleavable form of pro-scatter factor suppresses tumor growth and dissemination in mice. *J Clin Invest* 114, 1418–1432.

McKay, M.M., and Morrison, D.K. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26, 3113–3121.

Mebratu, Y.A., Dickey, B.F., Evans, C., and Tesfagzi, Y. (2008). The BH3-only protein Bik/Blk/Nbk inhibits nuclear translocation of activated ERK1/2 to mediate IFN γ -induced cell death. *J. Cell Biol.* 183, 429–439.

- Mebratu, Y.A., Leyva-Baca, I., Wathelet, M.G., Lacey, N., Chand, H.S., Choi, A.M.K., and Tesfaigzi, Y. (2017). Bik reduces hyperplastic cells by increasing Bak and activating DAPK1 to juxtapose ER and mitochondria. *Nat Commun* 8, 803.
- Mehlen, P., and Bredesen, D.E. (2004). The dependence receptor hypothesis. *Apoptosis* 9, 37–49.
- Mehlen, P., and Fearon, E.R. (2004). Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J. Clin. Oncol.* 22, 3420–3428.
- Mehlen, P., and Tauszig-Delamasure, S. (2014). Dependence receptors and colorectal cancer. *Gut* 63, 1821–1829.
- Mehlen, P., Rabizadeh, S., Snipas, S.J., Assa-Munt, N., Salvesen, G.S., and Bredesen, D.E. (1998). The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 395, 801–804.
- Meier, P.J., Spycher, M.A., and Meyer, U.A. (1981). Isolation and characterization of rough endoplasmic reticulum associated with mitochondria from normal rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 646, 283–297.
- Meijerink, J.P., Mensink, E.J., Wang, K., Sedlak, T.W., Slöetjes, A.W., de Witte, T., Waksman, G., and Korsmeyer, S.J. (1998). Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood* 91, 2991–2997.
- Ménard, M., Costechareyre, C., Ichim, G., Blachier, J., Neves, D., Jarrosson-Wuilleme, L., Depping, R., Koster, J., Saintigny, P., Mehlen, P., et al. (2018). Hey1- and p53-dependent TrkC proapoptotic activity controls neuroblastoma growth. *PLoS Biol.* 16, e2002912.
- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181–190.
- Mille, F., Llambi, F., Guix, C., Delloye-Bourgeois, C., Guenebeaud, C., Castro-Obregon, S., Bredesen, D.E., Thibert, C., and Mehlen, P. (2009). Interfering with multimerization of netrin-1 receptors triggers tumor cell death. *Cell Death Differ.* 16, 1344–1351.
- Mizutani, Y., Nakanishi, H., Yamamoto, K., Li, Y.N., Matsubara, H., Mikami, K., Okihara, K., Kawauchi, A., Bonavida, B., and Miki, T. (2005). Downregulation of Smac/DIABLO expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance. *J. Clin. Oncol.* 23, 448–454.
- Mizutani, Y., Katsuoka, Y., and Bonavida, B. (2010). Prognostic significance of second mitochondria-derived activator of caspase (Smac/DIABLO) expression in bladder cancer and target for therapy. *Int. J. Oncol.* 37, 503–508.
- Monaco, G., Beckers, M., Ivanova, H., Missiaen, L., Parys, J.B., De Smedt, H., and Bultynck, G. (2012). Profiling of the Bcl-2/Bcl-X(L)-binding sites on type 1 IP(3) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 428, 31–35.
- Monaco, G., Vervliet, T., Akl, H., and Bultynck, G. (2013). The selective BH4-domain biology of Bcl-2-family members: IP3Rs and beyond. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 1171–1183.
- Monni, O., Joensuu, H., Franssila, K., Klefstrom, J., Alitalo, K., and Knuutila, S. (1997). BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 90, 1168–1174.

- Montagne, R., Furlan, A., Kherrouche, Z., and Tulasne, D. (2014). [Thirty years of Met receptor research: from the discovery of an oncogene to the development of targeted therapies]. *Med Sci (Paris)* *30*, 864–873.
- Montagne, R., Berbon, M., Doublet, L., Debreuck, N., Baranzelli, A., Drobecq, H., Leroy, C., Delhem, N., Porte, H., Copin, M.-C., et al. (2015). Necrosis- and apoptosis-related Met cleavages have divergent functional consequences. *Cell Death Dis* *6*, e1769.
- Montagne, R., Baranzelli, A., Muharram, G., Catherine, L., Lesaffre, M., Vincent, A., Kherrouche, Z., Werkmeister, E., Cortot, A.B., and Tulasne, D. (2017). MET receptor variant R970C favors calpain-dependent generation of a fragment promoting epithelial cell scattering. *Oncotarget* *8*, 11268–11283.
- Montesano, R., Schaller, G., and Orci, L. (1991). Induction of epithelial tubular morphogenesis in vitro by fibroblast-derived soluble factors. *Cell* *66*, 697–711.
- Moumen, A., Patané, S., Porras, A., Dono, R., and Maina, F. (2007). Met acts on Mdm2 via mTOR to signal cell survival during development. *Development* *134*, 1443–1451.
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettekheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., et al. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* *381*, 335–341.
- Muharram, G., Sahgal, P., Korpela, T., De Franceschi, N., Kaukonen, R., Clark, K., Tulasne, D., Carpen, O., and Ivaska, J. (2014). Tensin-4-dependent MET stabilization is essential for survival and proliferation in carcinoma cells. *Dev. Cell* *29*, 421–436.
- Muller, P.A.J., and Vousden, K.H. (2014). Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* *25*, 304–317.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., et al. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* *85*, 817–827.
- Nakagawara, A. (2001). Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett.* *169*, 107–114.
- Nakamura, T., Nawa, K., and Ichihara, A. (1984). Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *122*, 1450–1459.
- Nakamura, T., Teramoto, H., and Ichihara, A. (1986). Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *83*, 6489–6493.
- Nakamura, T., Mizuno, S., Matsumoto, K., Sawa, Y., Matsuda, H., and Nakamura, T. (2000). Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J. Clin. Invest.* *106*, 1511–1519.
- Nakamura, Y., Niki, T., Goto, A., Morikawa, T., Miyazawa, K., Nakajima, J., and Fukayama, M. (2007). c-Met activation in lung adenocarcinoma tissues: an immunohistochemical analysis. *Cancer Sci.* *98*, 1006–1013.

- Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* 7, 683–694.
- Nakatani, Y., Kleffmann, T., Linke, K., Condon, S.M., Hinds, M.G., and Day, C.L. (2013). Regulation of ubiquitin transfer by XIAP, a dimeric RING E3 ligase. *Biochem. J.* 450, 629–638.
- Nakayama, M., Sakai, K., Yamashita, A., Nakamura, T., Suzuki, Y., and Matsumoto, K. (2013). Met/HGF receptor activation is regulated by juxtamembrane Ser985 phosphorylation in hepatocytes. *Cytokine* 62, 446–452.
- Nakopoulou, Gakiopoulou, Keramopoulos, Giannopoulou, Athanassiadou, Mavrommatis, and Davaris c-met tyrosine kinase receptor expression is associated with abnormal β -catenin expression and favourable prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Histopathology* 36, 313–325.
- Naldini, L., Weidner, K.M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzetto, C., Narsimhan, R.P., Hartmann, G., Zarnegar, R., and Michalopoulos, G.K. (1991). Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J.* 10, 2867–2878.
- Naon, D., and Scorrano, L. (2014). At the right distance: ER-mitochondria juxtaposition in cell life and death. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 2184–2194.
- Naresh, A., Long, W., Vidal, G.A., Wimley, W.C., Marrero, L., Sartor, C.I., Tovey, S., Cooke, T.G., Bartlett, J.M.S., and Jones, F.E. (2006). The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Res.* 66, 6412–6420.
- Natali, P.G., Prat, M., Nicotra, M.R., Bigotti, A., Olivero, M., Comoglio, P.M., and Di Renzo, M.F. (1996). Overexpression of the met/HGF receptor in renal cell carcinomas. *Int. J. Cancer* 69, 212–217.
- Ndubaku, C., Cohen, F., Varfolomeev, E., and Vucic, D. (2009). Targeting inhibitor of apoptosis proteins for therapeutic intervention. *Future Med Chem* 1, 1509–1525.
- Negulescu, A.-M., and Mehlen, P. (2018). Dependence receptors - the dark side awakens. *FEBS J.*
- Nguyen, L., Holgado-Madruga, M., Maroun, C., Fixman, E.D., Kamikura, D., Fournier, T., Charest, A., Tremblay, M.L., Wong, A.J., and Park, M. (1997). Association of the multisubstrate docking protein Gab1 with the hepatocyte growth factor receptor requires a functional Grb2 binding site involving tyrosine 1356. *J. Biol. Chem.* 272, 20811–20819.
- Nicholls, D.G. (2002). Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1372–1381.
- Nicholson, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 6, 1028–1042.
- Nieto, P., Ambrogio, C., Esteban-Burgos, L., Gómez-López, G., Blasco, M.T., Yao, Z., Marais, R., Rosen, N., Chiarle, R., Pisano, D.G., et al. (2017). A Braf kinase-inactive mutant induces lung adenocarcinoma. *Nature* 548, 239–243.
- Niki, M., Isozaki, H., Toyoda, M., Ishibashi, T., Fujii, K., Nomura, E., Mabuchi, H., Nakamura, M., Nishiguchi, K., and Tanigawa, N. (1999). Serum human hepatocyte growth factor (hHGF) is elevated in patients with metastatic gastric carcinoma. *Hepato-gastroenterology* 46, 568–573.

- Nilsson, I., Bahram, F., Li, X., Gualandi, L., Koch, S., Jarvius, M., Söderberg, O., Anisimov, A., Kholová, I., Pytowski, B., et al. (2010). VEGF receptor 2/3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts. *EMBO J.* *29*, 1377–1388.
- Noonan, S.A., Berry, L., Lu, X., Gao, D., Barón, A.E., Chesnut, P., Sheren, J., Aisner, D.L., Merrick, D., Doebele, R.C., et al. (2016). Identifying the Appropriate FISH Criteria for Defining MET Copy Number-Driven Lung Adenocarcinoma through Oncogene Overlap Analysis. *J Thorac Oncol* *11*, 1293–1304.
- Nuñez, G., London, L., Hockenbery, D., Alexander, M., McKearn, J.P., and Korsmeyer, S.J. (1990). Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J. Immunol.* *144*, 3602–3610.
- Nutt, L.K., Pataer, A., Pahler, J., Fang, B., Roth, J., McConkey, D.J., and Swisher, S.G. (2002). Bax and Bak Promote Apoptosis by Modulating Endoplasmic Reticular and Mitochondrial Ca²⁺ Stores. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 9219–9225.
- Oakes, S.A., Scorrano, L., Opferman, J.T., Bassik, M.C., Nishino, M., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2005). Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 105–110.
- Oakes, S.R., Vaillant, F., Lim, E., Lee, L., Breslin, K., Feleppa, F., Deb, S., Ritchie, M.E., Takano, E., Ward, T., et al. (2012). Sensitization of BCL-2-expressing breast tumors to chemotherapy by the BH3 mimetic ABT-737. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 2766–2771.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* *288*, 1053–1058.
- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., and Hynes, N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* *19*, 3159–3167.
- Olejniczak, E.T., Van Sant, C., Anderson, M.G., Wang, G., Tahir, S.K., Sauter, G., Lesniewski, R., and Semizarov, D. (2007). Integrative genomic analysis of small-cell lung carcinoma reveals correlates of sensitivity to bcl-2 antagonists and uncovers novel chromosomal gains. *Mol. Cancer Res.* *5*, 331–339.
- Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 359–371.
- Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., et al. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* *435*, 677–681.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* *74*, 609–619.
- Onozato, R., Kosaka, T., Kuwano, H., Sekido, Y., Yatabe, Y., and Mitsudomi, T. (2009). Activation of MET by gene amplification or by splice mutations deleting the juxtamembrane domain in primary resected lung cancers. *J Thorac Oncol* *4*, 5–11.
- Ornitz, D.M., and Marie, P.J. (2015). Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes Dev.* *29*, 1463–1486.

- Ou, S.-H.I., Kwak, E.L., Siwak-Tapp, C., Dy, J., Bergethon, K., Clark, J.W., Camidge, D.R., Solomon, B.J., Maki, R.G., Bang, Y.-J., et al. (2011). Activity of crizotinib (PF02341066), a dual mesenchymal-epithelial transition (MET) and anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor, in a non-small cell lung cancer patient with de novo MET amplification. *J Thorac Oncol* 6, 942–946.
- Owen, K.A., Qiu, D., Alves, J., Schumacher, A.M., Kilpatrick, L.M., Li, J., Harris, J.L., and Ellis, V. (2010). Pericellular activation of hepatocyte growth factor by the transmembrane serine proteases matriptase and hepsin, but not by the membrane-associated protease uPA. *Biochem. J.* 426, 219–228.
- Paik, P.K., Drilon, A., Fan, P.-D., Yu, H., Rekhtman, N., Ginsberg, M.S., Borsu, L., Schultz, N., Berger, M.F., Rudin, C.M., et al. (2015). Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discov* 5, 842–849.
- Palade, G.E. (1952). The fine structure of mitochondria. *Anat. Rec.* 114, 427–451.
- Palka, H.L., Park, M., and Tonks, N.K. (2003). Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *J. Biol. Chem.* 278, 5728–5735.
- Parachoniak, C.A., Luo, Y., Abella, J.V., Keen, J.H., and Park, M. (2011). GGA3 functions as a switch to promote Met receptor recycling, essential for sustained ERK and cell migration. *Dev. Cell* 20, 751–763.
- Paradisi, A., Creveaux, M., Gibert, B., Devailly, G., Redoulez, E., Neves, D., Cleysac, E., Treilleux, I., Klein, C., Niederfellner, G., et al. (2013). Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. *EMBO Molecular Medicine* 5, 1821–1834.
- Park, M., Dean, M., Cooper, C.S., Schmidt, M., O'Brien, S.J., Blair, D.G., and Vande Woude, G.F. (1986). Mechanism of met oncogene activation. *Cell* 45, 895–904.
- Park, S., Choi, Y.-L., Sung, C.O., An, J., Seo, J., Ahn, M.-J., Ahn, J.S., Park, K., Shin, Y.K., Erkin, O.C., et al. (2012). High MET copy number and MET overexpression: poor outcome in non-small cell lung cancer patients. *Histol. Histopathol.* 27, 197–207.
- Park, S., Koh, J., Kim, D.-W., Kim, M., Keam, B., Kim, T.M., Jeon, Y.K., Chung, D.H., and Heo, D.S. (2015). MET amplification, protein expression, and mutations in pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer* 90, 381–387.
- Pellicci, G., Giordano, S., Zhen, Z., Salcini, A.E., Lanfrancone, L., Bardelli, A., Panayotou, G., Waterfield, M.D., Ponzetto, C., and Pellicci, P.G. (1995). The motogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein. *Oncogene* 10, 1631–1638.
- Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzone, M., Giordano, S., and Comoglio, P.M. (2003). Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 3, 347–361.
- Peschard, P., and Park, M. (2007). From Tpr-Met to Met, tumorigenesis and tubes. *Oncogene* 26, 1276–1285.
- Peschard, P., Fournier, T.M., Lamorte, L., Naujokas, M.A., Band, H., Langdon, W.Y., and Park, M. (2001). Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol. Cell* 8, 995–1004.

- Peschard, P., Ishiyama, N., Lin, T., Lipkowitz, S., and Park, M. (2004). A conserved DpYR motif in the juxtamembrane domain of the Met receptor family forms an atypical c-Cbl/Cbl-b tyrosine kinase binding domain binding site required for suppression of oncogenic activation. *J. Biol. Chem.* *279*, 29565–29571.
- Petrelli, A., Circosta, P., Granziero, L., Mazzone, M., Pisacane, A., Fenoglio, S., Comoglio, P.M., and Giordano, S. (2006). Ab-induced ectodomain shedding mediates hepatocyte growth factor receptor down-regulation and hampers biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 5090–5095.
- Pfaff, E., and Klingenberg, M. (1968). Adenine nucleotide translocation of mitochondria. 1. Specificity and control. *Eur. J. Biochem.* *6*, 66–79.
- Pickett, C.B., Montisano, D., Eisner, D., and Cascarano, J. (1980). The physical association between rat liver mitochondria and rough endoplasmic reticulum. I. Isolation, electron microscopic examination and sedimentation equilibrium centrifugation analyses of rough endoplasmic reticulum-mitochondrial complexes. *Exp. Cell Res.* *128*, 343–352.
- Pinton, P., Ferrari, D., Magalhães, P., Schulze-Osthoff, K., Di Virgilio, F., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (2000). Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J. Cell Biol.* *148*, 857–862.
- Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G., and Comoglio, P.M. (1994). A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* *77*, 261–271.
- Ponzetto, C., Zhen, Z., Audero, E., Maina, F., Bardelli, A., Basile, M.L., Giordano, S., Narsimhan, R., and Comoglio, P. (1996). Specific uncoupling of GRB2 from the Met receptor. Differential effects on transformation and motility. *J. Biol. Chem.* *271*, 14119–14123.
- Pyo, J.-S., Kang, G., and Cho, H. (2016). Clinicopathological Significance and Diagnostic Accuracy of c-MET Expression by Immunohistochemistry in Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *J Gastric Cancer* *16*, 141–151.
- Qian, S., Wang, W., Yang, L., and Huang, H.W. (2008). Structure of transmembrane pore induced by Bax-derived peptide: evidence for lipidic pores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 17379–17383.
- Rabizadeh, S., Oh, J., Zhong, L.T., Yang, J., Bitler, C.M., Butcher, L.L., and Bredesen, D.E. (1993). Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* *261*, 345–348.
- Rahimi, N., Hung, W., Tremblay, E., Saulnier, R., and Elliott, B. (1998). c-Src kinase activity is required for hepatocyte growth factor-induced motility and anchorage-independent growth of mammary carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* *273*, 33714–33721.
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J.C., and Perucho, M. (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* *275*, 967–969.
- Reveneau, S., Paumelle, R., Deheuninck, J., Leroy, C., De Launoit, Y., and Fafeur, V. (2003). Inhibition of JNK by HGF/SF prevents apoptosis induced by TNF-alpha. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1010*, 100–103.
- Riedl, S.J., and Salvesen, G.S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 405–413.

- Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., and Pozzan, T. (1993). Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262, 744–747.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., and Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 280, 1763–1766.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 566–578.
- Roberts, A.W., Davids, M.S., Pagel, J.M., Kahl, B.S., Puvvada, S.D., Gerecitano, J.F., Kipps, T.J., Anderson, M.A., Brown, J.R., Gressick, L., et al. (2016). Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 374, 311–322.
- Robinson, D.R., Wu, Y.M., and Lin, S.F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19, 5548–5557.
- Rodrigues, G.A., Falasca, M., Zhang, Z., Ong, S.H., and Schlessinger, J. (2000). A Novel Positive Feedback Loop Mediated by the Docking Protein Gab1 and Phosphatidylinositol 3-Kinase in Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. *Mol. Cell Biol.* 20, 1448–1459.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519–529.
- Rong, Y., and Distelhorst, C.W. (2008). Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 73–91.
- Rong, Y.-P., Aromolaran, A.S., Bultynck, G., Zhong, F., Li, X., McColl, K., Matsuyama, S., Herlitze, S., Roderick, H.L., Bootman, M.D., et al. (2008). Targeting Bcl-2-IP₃ receptor interaction to reverse Bcl-2's inhibition of apoptotic calcium signals. *Mol. Cell* 31, 255–265.
- Rong, Y.-P., Bultynck, G., Aromolaran, A.S., Zhong, F., Parys, J.B., De Smedt, H., Mignery, G.A., Roderick, H.L., Bootman, M.D., and Distelhorst, C.W. (2009). The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP₃ receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 14397–14402.
- Rosell, R., Carcereny, E., Gervais, R., Vergnenegre, A., Massuti, B., Felip, E., Palmero, R., Garcia-Gomez, R., Pallares, C., Sanchez, J.M., et al. (2012). Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 13, 239–246.
- Rosen, E.M., Laterra, J., Joseph, A., Jin, L., Fuchs, A., Way, D., Witte, M., Weinand, M., and Goldberg, I.D. (1996). Scatter factor expression and regulation in human glial tumors. *Int. J. Cancer* 67, 248–255.
- Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *The EMBO Journal* 16, 6914–6925.
- Ryan, K.M., Phillips, A.C., and Vousden, K.H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 332–337.

- Sachs, M., Brohmann, H., Zechner, D., Müller, T., Hülsken, J., Walther, I., Schaeper, U., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2000). Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo. *J. Cell Biol.* *150*, 1375–1384.
- Sakamaki, Y., Matsumoto, K., Mizuno, S., Miyoshi, S., Matsuda, H., and Nakamura, T. (2002). Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of respiratory epithelial cells during postpneumonectomy compensatory lung growth in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *26*, 525–533.
- Sangwan, V., Paliouras, G.N., Abella, J.V., Dubé, N., Monast, A., Tremblay, M.L., and Park, M. (2008). Regulation of the Met receptor-tyrosine kinase by the protein-tyrosine phosphatase 1B and T-cell phosphatase. *J. Biol. Chem.* *283*, 34374–34383.
- Sangwan, V., Abella, J., Lai, A., Bertos, N., Stuibler, M., Tremblay, M.L., and Park, M. (2011). Protein-tyrosine phosphatase 1B modulates early endosome fusion and trafficking of Met and epidermal growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* *286*, 45000–45013.
- Sattler, M., Liang, H., Nettlesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., et al. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* *275*, 983–986.
- Scagliotti, G., von Pawel, J., Novello, S., Ramlau, R., Favaretto, A., Barlesi, F., Akerley, W., Orlov, S., Santoro, A., Spigel, D., et al. (2015). Phase III Multinational, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Tivantinib (ARQ 197) Plus Erlotinib Versus Erlotinib Alone in Previously Treated Patients With Locally Advanced or Metastatic Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* *33*, 2667–2674.
- Scagliotti, G.V., Novello, S., and von Pawel, J. (2013). The emerging role of MET/HGF inhibitors in oncology. *Cancer Treat. Rev.* *39*, 793–801.
- Schaeper, U., Gehring, N.H., Fuchs, K.P., Sachs, M., Kempkes, B., and Birchmeier, W. (2000). Coupling of Gab1 to C-Met, Grb2, and Shp2 Mediates Biological Responses. *J Cell Biol* *149*, 1419–1432.
- Schiering, N., Knapp, S., Marconi, M., Flocco, M.M., Cui, J., Peregó, R., Rusconi, L., and Cristiani, C. (2003). Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the hepatocyte growth factor receptor c-Met and its complex with the microbial alkaloid K-252a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 12654–12659.
- Schildhaus, H.-U., Schultheis, A.M., Rüschoff, J., Binot, E., Merkelbach-Bruse, S., Fassunke, J., Schulte, W., Ko, Y.-D., Schlesinger, A., Bos, M., et al. (2015). MET amplification status in therapy-naïve adeno- and squamous cell carcinomas of the lung. *Clin. Cancer Res.* *21*, 907–915.
- Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., and Birchmeier, C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* *373*, 699–702.
- Schmidt, L., Duh, F.M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S.W., Zhuang, Z., Lubensky, I., Dean, M., et al. (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat. Genet.* *16*, 68–73.
- Schmitt, C.A., Rosenthal, C.T., and Lowe, S.W. (2000). Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. *Nat. Med.* *6*, 1029–1035.

- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* *300*, 135–139.
- Scott, F.L., Denault, J.-B., Riedl, S.J., Shin, H., Renatus, M., and Salvesen, G.S. (2005). XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J.* *24*, 645–655.
- Seki, T., Hagiya, M., Shimonishi, M., Nakamura, T., and Shimizu, S. (1991). Organization of the human hepatocyte growth factor-encoding gene. *Gene* *102*, 213–219.
- Sentman, C.L., Shutter, J.R., Hockenbery, D., Kanagawa, O., and Korsmeyer, S.J. (1991). bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* *67*, 879–888.
- Shah, M.A., Wainberg, Z.A., Catenacci, D.V.T., Hochster, H.S., Ford, J., Kunz, P., Lee, F.-C., Kallender, H., Cecchi, F., Rabe, D.C., et al. (2013). Phase II study evaluating 2 dosing schedules of oral foretinib (GSK1363089), cMET/VEGFR2 inhibitor, in patients with metastatic gastric cancer. *PLoS ONE* *8*, e54014.
- Shah, M.A., Bang, Y.-J., Lordick, F., Tabernero, J., Chen, M., Hack, S.P., Phan, S.-C., Shames, D.S., and Cunningham, D. (2015). METGastric: A phase III study of onartuzumab plus mFOLFOX6 in patients with metastatic HER2-negative (HER2-) and MET-positive (MET+) adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction (GEC). *JCO* *33*, 4012–4012.
- Shang, J., Deguchi, K., Ohta, Y., Liu, N., Zhang, X., Tian, F., Yamashita, T., Ikeda, Y., Matsuura, T., Funakoshi, H., et al. (2011). Strong neurogenesis, angiogenesis, synaptogenesis, and antifibrosis of hepatocyte growth factor in rats brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J. Neurosci. Res.* *89*, 86–95.
- Shiao, Y.J., Lupo, G., and Vance, J.E. (1995). Evidence that phosphatidylserine is imported into mitochondria via a mitochondria-associated membrane and that the majority of mitochondrial phosphatidylethanolamine is derived from decarboxylation of phosphatidylserine. *J. Biol. Chem.* *270*, 11190–11198.
- Shieh, J.-M., Tang, Y.-A., Yang, T.-H., Chen, C.-Y., Hsu, H.-S., Tan, Y.-H.C., Salgia, R., and Wang, Y.-C. (2013). Lack of association of C-Met-N375S sequence variant with lung cancer susceptibility and prognosis. *Int J Med Sci* *10*, 988–994.
- Shiozaki, E.N., Chai, J., Rigotti, D.J., Riedl, S.J., Li, P., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Fairman, R., and Shi, Y. (2003). Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol. Cell* *11*, 519–527.
- Shoemaker, A.R., Mitten, M.J., Adickes, J., Ackler, S., Refici, M., Ferguson, D., Oleksijew, A., O'Connor, J.M., Wang, B., Frost, D.J., et al. (2008). Activity of the Bcl-2 family inhibitor ABT-263 in a panel of small cell lung cancer xenograft models. *Clin. Cancer Res.* *14*, 3268–3277.
- Sibilia, M., and Wagner, E.F. (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* *269*, 234–238.
- Siegfried, J.M., Weissfeld, L.A., Singh-Kaw, P., Weyant, R.J., Testa, J.R., and Landreneau, R.J. (1997). Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* *57*, 433–439.

- Sikic, B.I., Eckhardt, S.G., Gallant, G., Burris, H.A., Camidge, D.R., Colevas, A.D., Jones, S.F., Messersmith, W.A., Wakelee, H.A., Li, H., et al. (2011). Safety, pharmacokinetics (PK), and pharmacodynamics (PD) of HGS1029, an inhibitor of apoptosis protein (IAP) inhibitor, in patients (Pts) with advanced solid tumors: Results of a phase I study. *JCO* 29, 3008–3008.
- Simonian, P.L., Grillot, D.A., Andrews, D.W., Leber, B., and Nuñez, G. (1996). Bax homodimerization is not required for Bax to accelerate chemotherapy-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 271, 32073–32077.
- Sinicropo, F.A., Rego, R.L., Okumura, K., Foster, N.R., O’Connell, M.J., Sargent, D.J., and Windschitl, H.E. (2008). Prognostic impact of bim, puma, and noxa expression in human colon carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 14, 5810–5818.
- Sjöstrand, F.S. (1953). Electron Microscopy of Mitochondria and Cytoplasmic Double Membranes: Ultra-Structure of Rod-shaped Mitochondria. *Nature* 171, 30–31.
- Smolen, G.A., Sordella, R., Muir, B., Mohapatra, G., Barmettler, A., Archibald, H., Kim, W.J., Okimoto, R.A., Bell, D.W., Sgroi, D.C., et al. (2006). Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2316–2321.
- Soengas, M.S., Capodiceci, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J.G., Gerald, W.L., Lazebnik, Y.A., et al. (2001). Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409, 207–211.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X.R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., and Yi, T. (1994). Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2777–2785.
- Spigel, D.R., Ervin, T.J., Ramlau, R., Daniel, D.B., Goldschmidt, J.H., Blumenschein, G.R., Krzakowski, M.J., Robinet, G., Clement-Duchene, C., Barlesi, F., et al. (2011). Final efficacy results from OAM4558g, a randomized phase II study evaluating MetMab or placebo in combination with erlotinib in advanced NSCLC. *JCO* 29, 7505–7505.
- Spigel, D.R., Edelman, M.J., O’Byrne, K., Paz-Ares, L., Mocci, S., Phan, S., Shames, D.S., Smith, D., Yu, W., Paton, V.E., et al. (2017). Results From the Phase III Randomized Trial of Onartuzumab Plus Erlotinib Versus Erlotinib in Previously Treated Stage IIIB or IV Non-Small-Cell Lung Cancer: METLung. *J. Clin. Oncol.* 35, 412–420.
- Sprick, M.R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M.A., and Walczak, H. (2002). Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J.* 21, 4520–4530.
- Stamos, J., Lazarus, R.A., Yao, X., Kirchhofer, D., and Wiesmann, C. (2004). Crystal structure of the HGF beta-chain in complex with the Sema domain of the Met receptor. *EMBO J.* 23, 2325–2335.
- Stennicke, H.R., Renatus, M., Meldal, M., and Salvesen, G.S. (2000). Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8. *Biochem. J.* 350 Pt 2, 563–568.
- Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M., and Gray, J. (1987). Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 327, 239–242.

- Strasser, A., Harris, A.W., and Cory, S. (1991). *bcl-2* transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 67, 889–899.
- Strohecker, A.M., Yehiely, F., Chen, F., and Cryns, V.L. (2008). Caspase Cleavage of HER-2 Releases a Bad-like Cell Death Effector. *J. Biol. Chem.* 283, 18269–18282.
- Suzuki, M., Youle, R.J., and Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645–654.
- Szabadkai, G., Bianchi, K., Várnai, P., Stefani, D.D., Wieckowski, M.R., Cavagna, D., Nagy, A.I., Balla, T., and Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol* 175, 901–911.
- Szabó, I., and Zoratti, M. (1993). The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS Lett.* 330, 201–205.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 621–632.
- Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1998). A Single BIR Domain of XIAP Sufficient for Inhibiting Caspases. *J. Biol. Chem.* 273, 7787–7790.
- Takeuchi, H., Bilchik, A., Saha, S., Turner, R., Wiese, D., Tanaka, M., Kuo, C., Wang, H.-J., and Hoon, D.S.B. (2003). c-MET expression level in primary colon cancer: a predictor of tumor invasion and lymph node metastases. *Clin. Cancer Res.* 9, 1480–1488.
- Talanian, R.V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M.C., Mankovich, J.A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K.D., and Wong, W.W. (1997). Substrate specificities of caspase family proteases. *J. Biol. Chem.* 272, 9677–9682.
- Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D.A., Vigna, N., Oltersdorf, T., and Reed, J.C. (1998). IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 58, 5315–5320.
- Tang, Z., Zhao, M., Ji, J., Yang, G., Hu, F., He, J., Shen, H., Gao, Z., Zhao, A., Li, J., et al. (2004). Overexpression of gastrin and c-met protein involved in human gastric carcinomas and intestinal metaplasia. *Oncol. Rep.* 11, 333–339.
- Tanimoto, S., Fukumori, T., El-Moula, G., Shiirevnyamba, A., Kinouchi, S., Koizumi, T., Nakanishi, R., Yamamoto, Y., Taue, R., Yamaguchi, K., et al. (2008). Prognostic significance of serum hepatocyte growth factor in clear cell renal cell carcinoma: comparison with serum vascular endothelial growth factor. *J. Med. Invest.* 55, 106–111.
- Tauszig-Delamasure, S., Yu, L.-Y., Cabrera, J.R., Bouzas-Rodriguez, J., Mermet-Bouvier, C., Guix, C., Bordeaux, M.-C., Arumäe, U., and Mehlen, P. (2007). The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 13361–13366.
- Tempest, P.R., Stratton, M.R., and Cooper, C.S. (1988). Structure of the met protein and variation of met protein kinase activity among human tumour cell lines. *Br. J. Cancer* 58, 3–7.
- Terashima, M., Togashi, Y., Sato, K., Mizuuchi, H., Sakai, K., Suda, K., Nakamura, Y., Banno, E., Hayashi, H., De Velasco, M.A., et al. (2016). Functional Analyses of Mutations in Receptor Tyrosine

Kinase Genes in Non-Small Cell Lung Cancer: Double-Edged Sword of DDR2. *Clin. Cancer Res.* 22, 3663–3671.

Theus, M.H., Ricard, J., Glass, S.J., Travieso, L.G., and Liebl, D.J. (2014). EphrinB3 blocks EphB3 dependence receptor functions to prevent cell death following traumatic brain injury. *Cell Death Dis* 5, e1207.

Thiebault, K., Mazelin, L., Pays, L., Llambi, F., Joly, M.-O., Scoazec, J.-Y., Saurin, J.-C., Romeo, G., and Mehlen, P. (2003). The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4173–4178.

Thornberry, N.A. (1998). Caspases: Enemies Within. *Science* 281, 1312–1316.

Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., et al. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 17907–17911.

Tiran, Z., Oren, A., Hermesh, C., Rotman, G., Levine, Z., Amitai, H., Handelsman, T., Beiman, M., Chen, A., Landesman-Milo, D., et al. (2008). A Novel Recombinant Soluble Splice Variant of Met Is a Potent Antagonist of the Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor-Met Pathway. *Clin Cancer Res* 14, 4612–4621.

Todt, F., Cakir, Z., Reichenbach, F., Youle, R.J., and Edlich, F. (2013). The C-terminal helix of Bcl-xL mediates Bax retrotranslocation from the mitochondria. *Cell Death Differ* 20, 333–342.

Togashi, Y., Mizuuchi, H., Tomida, S., Terashima, M., Hayashi, H., Nishio, K., and Mitsudomi, T. (2015). MET gene exon 14 deletion created using the CRISPR/Cas9 system enhances cellular growth and sensitivity to a MET inhibitor. *Lung Cancer* 90, 590–597.

Toi, M., Taniguchi, T., Ueno, T., Asano, M., Funata, N., Sekiguchi, K., Iwanari, H., and Tominaga, T. (1998). Significance of circulating hepatocyte growth factor level as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 4, 659–664.

Toiyama, Y., Miki, C., Inoue, Y., Okugawa, Y., Tanaka, K., and Kusunoki, M. (2009). Serum hepatocyte growth factor as a prognostic marker for stage II or III colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* 125, 1657–1662.

Tomioka, D., Maehara, N., Kuba, K., Mizumoto, K., Tanaka, M., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (2001). Inhibition of Growth, Invasion, and Metastasis of Human Pancreatic Carcinoma Cells by NK4 in an Orthotopic Mouse Model. *Cancer Res* 61, 7518–7524.

Tong, J.H.M., Lung, R.W.M., Sin, F.M.C., Law, P.P.Y., Kang, W., Chan, A.W.H., Ma, B.B.Y., Mak, T.W.C., Ng, S.S.M., and To, K.F. (2014). Characterization of rare transforming KRAS mutations in sporadic colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* 15, 768–776.

Trusolino, L., Bertotti, A., and Comoglio, P.M. (2010). MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 834–848.

Tsao, M.S., Yang, Y., Marcus, A., Liu, N., and Mou, L. (2001). Hepatocyte growth factor is predominantly expressed by the carcinoma cells in non-small-cell lung cancer. *Hum. Pathol.* 32, 57–65.

- Tse, C., Shoemaker, A.R., Adickes, J., Anderson, M.G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E.F., Marsh, K.C., Mitten, M.J., Nimmer, P., et al. (2008). ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* 68, 3421–3428.
- Tsenkina, Y., Ricard, J., Runko, E., Quiala-Acosta, M.M., Mier, J., and Liebl, D.J. (2015). EphB3 receptors function as dependence receptors to mediate oligodendrocyte cell death following contusive spinal cord injury. *Cell Death Dis* 6, e1922.
- Tsujimoto, Y. (1989). Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 alpha protein in human B lymphoblastoid cell. *Oncogene* 4, 1331–1336.
- Tsujimoto, Y., and Croce, C.M. (1986). Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5214–5218.
- Tsuta, K., Kozu, Y., Mimae, T., Yoshida, A., Kohno, T., Sekine, I., Tamura, T., Asamura, H., Furuta, K., and Tsuda, H. (2012). c-MET/Phospho-MET Protein Expression and MET Gene Copy Number in Non-small Cell Lung Carcinomas. *Journal of Thoracic Oncology* 7, 331–339.
- Tsuzuki, N., Miyazawa, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Shima, K. (2001). Hepatocyte growth factor reduces the infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neurol. Res.* 23, 417–424.
- Tulasne, D., and Foveau, B. (2008). The shadow of death on the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ.* 15, 427–434.
- Tulasne, D., Paumelle, R., Weidner, K.M., Vandenbunder, B., and Fafeur, V. (1999). The multisubstrate docking site of the MET receptor is dispensable for MET-mediated RAS signaling and cell scattering. *Mol. Biol. Cell* 10, 551–565.
- Tulasne, D., Deheuninck, J., Lourenco, F.C., Lamballe, F., Ji, Z., Leroy, C., Puchois, E., Moumen, A., Maina, F., Mehlen, P., et al. (2004). Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10328–10339.
- Turjanski, A.G., Vaqué, J.P., and Gutkind, J.S. (2007). MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 26, 3240–3253.
- Turke, A.B., Zejnullahu, K., Wu, Y.-L., Song, Y., Dias-Santagata, D., Lifshits, E., Toschi, L., Rogers, A., Mok, T., Sequist, L., et al. (2010). Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell* 17, 77–88.
- Tyner, J.W., Fletcher, L.B., Wang, E.Q., Yang, W.F., Rutenberg-Schoenberg, M.L., Beadling, C., Mori, M., Heinrich, M.C., Deininger, M.W., Druker, B.J., et al. (2010). MET receptor sequence variants R970C and T992I lack transforming capacity. *Cancer Res.* 70, 6233–6237.
- Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shiota, K., Kuno, J., Noda, T., and Kitamura, N. (1995). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373, 702–705.
- Ujiiie, H., Tomida, M., Akiyama, H., Nakajima, Y., Okada, D., Yoshino, N., Takiguchi, Y., and Tanzawa, H. (2012). Serum hepatocyte growth factor and interleukin-6 are effective prognostic markers for non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 32, 3251–3258.

- Vance, J.E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* 265, 7248–7256.
- Vaux, D.L., Cory, S., and Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440–442.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43–53.
- Vince, J.E., Wong, W.W.-L., Khan, N., Feltham, R., Chau, D., Ahmed, A.U., Benetatos, C.A., Chunduru, S.K., Condon, S.M., McKinlay, M., et al. (2007). IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF α -dependent apoptosis. *Cell* 131, 682–693.
- Wagner, M.J., Stacey, M.M., Liu, B.A., and Pawson, T. (2013). Molecular Mechanisms of SH2- and PTB-Domain-Containing Proteins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
- Wang, K.K.W. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends in Neurosciences* 23, 20–26.
- Wang, H., Boussoar, A., Mazelin, L., Tauszig-Delamasure, S., Sun, Y., Goldschneider, D., Paradisi, A., and Mehlen, P. (2018). The Proto-oncogene c-Kit Inhibits Tumor Growth by Behaving as a Dependence Receptor. *Mol. Cell*.
- Wang, J.J., Rabizadeh, S., Tasinato, A., Sperandio, S., Ye, X., Green, M., Assa-Munt, N., Spencer, D., and Bredesen, D.E. (2000). Dimerization-dependent block of the proapoptotic effect of p75(NTR). *J. Neurosci. Res.* 60, 587–593.
- Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev.* 10, 2859–2869.
- Wang, K., Gross, A., Waksman, G., and Korsmeyer, S.J. (1998). Mutagenesis of the BH3 domain of BAX identifies residues critical for dimerization and killing. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6083–6089.
- Wang, K., Lim, H.Y., Shi, S., Lee, J., Deng, S., Xie, T., Zhu, Z., Wang, Y., Pocalyko, D., Yang, W.J., et al. (2013). Genomic landscape of copy number aberrations enables the identification of oncogenic drivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 58, 706–717.
- Wang, R., Wei, Z., Jin, H., Wu, H., Yu, C., Wen, W., Chan, L.-N., Wen, Z., and Zhang, M. (2009). Autoinhibition of UNC5b revealed by the cytoplasmic domain structure of the receptor. *Mol. Cell* 33, 692–703.
- Wang, X., DeFrances, M.C., Dai, Y., Padiaditakis, P., Johnson, C., Bell, A., Michalopoulos, G.K., and Zarnegar, R. (2002). A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol. Cell* 9, 411–421.
- Waqar, S.N., Morgensztern, D., and Sehn, J. (2015). MET Mutation Associated with Responsiveness to Crizotinib. *J Thorac Oncol* 10, e29-31.
- Watermann, I., Schmitt, B., Stellmacher, F., Müller, J., Gaber, R., Kugler, C., Reinmuth, N., Huber, R.M., Thomas, M., Zabel, P., et al. (2015). Improved diagnostics targeting c-MET in non-small cell lung cancer: expression, amplification and activation? *Diagn Pathol* 10, 130.

- Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* *14*, 2060–2071.
- Wei, M.C., Zong, W.-X., Cheng, E.H.-Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science* *292*, 727–730.
- Weinstein, I.B., and Joe, A. (2008). Oncogene addiction. *Cancer Res.* *68*, 3077–3080; discussion 3080.
- Wen, J., Matsumoto, K., Taniura, N., Tomioka, D., and Nakamura, T. (2004). Hepatic gene expression of NK4, an HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor, suppresses liver metastasis and invasive growth of colon cancer in mice. *Cancer Gene Ther.* *11*, 419–430.
- Wikstrand, C.J., Reist, C.J., Archer, G.E., Zalutsky, M.R., and Bigner, D.D. (1998). The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J. Neurovirol.* *4*, 148–158.
- Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* *19*, 1294–1305.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., and Youle, R.J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* *139*, 1281–1292.
- Xiao, G.-H., Jeffers, M., Bellacosa, A., Mitsuuchi, Y., Woude, G.F.V., and Testa, J.R. (2001). Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *PNAS* *98*, 247–252.
- Xu, Y., Zhou, J., Carey, T.E., McHugh, J.B., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2012). Receptor-type Protein tyrosine phosphatase β regulates met phosphorylation and function in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* *14*, 1015–1022.
- Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1. *Dev. Cell* *13*, 365–376.
- Yan, B., Lim, M., Zhou, L., Kuick, C.H., Leong, M.Y., Yong, K.J., Aung, L., Salto-Tellez, M., and Chang, K.T.E. (2013). Identification of MET genomic amplification, protein expression and alternative splice isoforms in neuroblastomas. *J. Clin. Pathol.* *66*, 985–991.
- Yano, S., Wang, W., Li, Q., Matsumoto, K., Sakurama, H., Nakamura, T., Ogino, H., Kakiuchi, S., Hanibuchi, M., Nishioka, Y., et al. (2008). Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res.* *68*, 9479–9487.
- Yano, S., Yamada, T., Takeuchi, S., Tachibana, K., Minami, Y., Yatabe, Y., Mitsudomi, T., Tanaka, H., Kimura, T., Kudoh, S., et al. (2011). Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. *J Thorac Oncol* *6*, 2011–2017.

- Yao, Z., Yaeger, R., Rodrik-Outmezguine, V.S., Tao, A., Torres, N.M., Chang, M.T., Drosten, M., Zhao, H., Cecchi, F., Hembrough, T., et al. (2017). Tumours with class 3 BRAF mutants are sensitive to the inhibition of activated RAS. *Nature* *548*, 234–238.
- Yarden, Y., and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 127–137.
- Yeh, I., Botton, T., Talevich, E., Shain, A.H., Sparatta, A.J., de la Fouchardiere, A., Mully, T.W., North, J.P., Garrido, M.C., Gagnon, A., et al. (2015). Activating MET kinase rearrangements in melanoma and Spitz tumours. *Nat Commun* *6*, 7174.
- Yo, Y., Morishita, R., Nakamura, S., Tomita, N., Yamamoto, K., Moriguchi, A., Matsumoto, K., Nakamura, T., Higaki, J., and Ogihara, T. (1998). Potential role of hepatocyte growth factor in the maintenance of renal structure: anti-apoptotic action of HGF on epithelial cells. *Kidney Int.* *54*, 1128–1138.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* *107*, 881–891.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., and Kroemer, G. (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* *182*, 367–377.
- Zender, L., Spector, M.S., Xue, W., Flemming, P., Cordon-Cardo, C., Silke, J., Fan, S.-T., Luk, J.M., Wigler, M., Hannon, G.J., et al. (2006). Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell* *125*, 1253–1267.
- Zeng, Z., Weiser, M.R., D'Alessio, M., Grace, A., Shia, J., and Paty, P.B. (2004). Immunoblot analysis of c-Met expression in human colorectal cancer: overexpression is associated with advanced stage cancer. *Clin. Exp. Metastasis* *21*, 409–417.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* *87*, 619–628.
- Zhang, H., Nimmer, P.M., Tahir, S.K., Chen, J., Fryer, R.M., Hahn, K.R., Iciek, L.A., Morgan, S.J., Nasarre, M.C., Nelson, R., et al. (2007). Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival. *Cell Death Differ.* *14*, 943–951.
- Zhang, L., Yu, J., Park, B.H., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2000). Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* *290*, 989–992.
- Zhang, Y., Farenholtz, K.E., Yang, Y., Guessous, F., Dipierro, C.G., Calvert, V.S., Deng, J., Schiff, D., Xin, W., Lee, J.K., et al. (2013). Hepatocyte growth factor sensitizes brain tumors to c-MET kinase inhibition. *Clin. Cancer Res.* *19*, 1433–1444.
- Zhu, H., Naujokas, M.A., Fixman, E.D., Torossian, K., and Park, M. (1994). Tyrosine 1356 in the carboxyl-terminal tail of the HGF/SF receptor is essential for the transduction of signals for cell motility and morphogenesis. *J. Biol. Chem.* *269*, 29943–29948.
- Zmasek, C.M., Zhang, Q., Ye, Y., and Godzik, A. (2007). Surprising complexity of the ancestral apoptosis network. *Genome Biol* *8*, R226.

Zong, W.X., Lindsten, T., Ross, A.J., MacGregor, G.R., and Thompson, C.B. (2001). BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.* *15*, 1481–1486.